

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-108684

(43)Date of publication of application : 20.04.2001

(51)Int.CI.

G01N 33/58
C12M 1/00
C12N 15/09
C12Q 1/68
G01N 21/64
G01N 33/50
G01N 33/53
G01N 33/566

(21)Application number : 11-283826

(71)Applicant : HITACHI LTD

(22)Date of filing : 05.10.1999

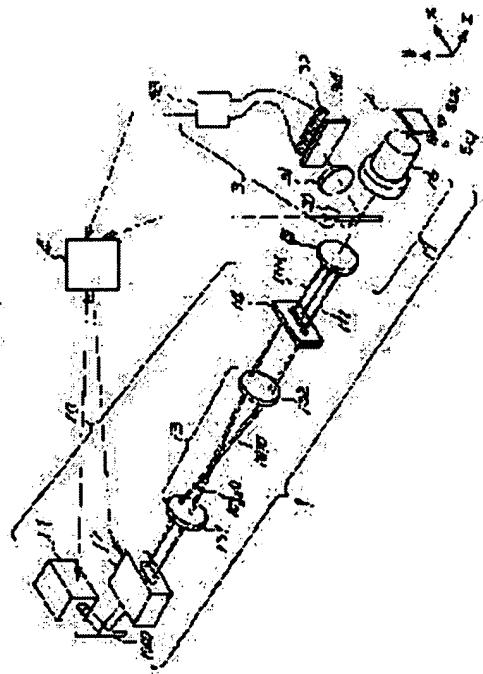
(72)Inventor : OSHIDA YOSHITADA
NAKADA TOSHIHIKO
SAKATA TOMOAKI
YASUDA KENJI
TAKAHASHI SATOSHI

(54) DNA TESTING METHOD AND DEVICE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To perform high-speed detection on a DNA chip formed of a large number of cells which is impossible by a conventional method to perform detection one piece by one piece and to eliminate difficulties in removing the effects of foreign matter and bringing a fluorescent surface into focus due to the small size of a picture element that one desires to detect in the case of a DNA chip.

SOLUTION: A DNA chip is simultaneously excited and irradiated with multi-spot array light to detect fluorescence simultaneously. Then the array light is moved in the direction of the array, and a detecting system and the chip are relatively moved at least in the direction orthogonal to the array to perform high-speed and accurate tests. The scattering of the exciting light from foreign matter is detected to



correct the detection results of the fluorescence. In addition, a fluorescent surface is irradiated with second light at an angle, and the fluorescent surface is brought into focus from the detected location of the reflected light.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 21.05.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3551860

[Date of registration] 14.05.2004

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

*** NOTICES ***

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]**[0001]**

[Field of the Invention] This invention relates to the equipment which inspects DNA by fluorescence detection. It is related with the DNA inspection approach of inspecting especially many living bodies' DNA at a high speed, and its equipment.

[0002]

[Description of the Prior Art] In inspection of the conventional DNA chip, one point irradiated the spot of excitation light on the DNA chip, and it was carrying out by the approach of carrying out sequential detection of the location of the request on a chip by carrying out confocal detection of the fluorescence generated by this irradiated excitation light changing the relative position of a DNA chip and a detection spot, and carrying out sequential change of the exposure location on a chip.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] It becomes indispensable to perform it at a high speed to much biopsy objects, if it is going to apply inspection of DNA to antemortem inspection like the conventional blood test. However, inspection which needs a DNA chip at a Prior art -- if one point irradiates the excitation light spot of this resolution and sequential detection of the fluorescence acquired is carried out to resolution, it will take inspection time amount sharply. This is related to time amount required for per this detection of one point not being made short without any restriction. That is, after irradiating excitation light, time amount Δt_{L} until fluorescence finishes occurring is eye a card game [10n second extent or] about. When it does not wait for fluorescence to finish but then moves from it to a detecting point, it becomes impossible to detect.

[0004] Moreover, it is required in the spot light size of above-mentioned required detection power to detect to high sensitivity to a condition which has some fluorescence molecules. However, all the generated fluorescence is not necessarily detected. That is, the photo-multiplier quantum efficiency used for the efficiency for light utilization and photodetection of detection optical system is not 100%. Furthermore, the effectiveness by which excitation light is absorbed by the fluorescence body, and the probability for the absorbed excitation light to change to fluorescence are small. For this reason, the detection precision [as opposed to /, so that it is necessary to detect over hundreds times / dozens to / as many time amount as this at least and this time amount is lengthened further / the feeble light near a photon count] of Δt_{L} becomes high.

[0005] Moreover, in order to attain such rapidity on practical use level, it is necessary to remove reduce the effect of the foreign matter which consists of various protein mixed in a DNA chip, or to always double the focus of a detection system with the control surface which carried out hybridization of the target which added the fluorescent substance. Moreover, it may be necessary to two or more fluorescence to inspect at a high speed.

[0006]

[Means for Solving the Problem] In order to solve the above-mentioned technical problem, the means as shown below is given in this invention.

[0007] from the diameter d of a spot below the dimension D of each cel -- becoming -- two or more -- the excitation light of M is irradiated at coincidence using an objective lens by covering time amount Δt beyond the fluorescence damping time in a mutually different location, the fluorescence acquired is led to a fluorescence detection optical path, and it has the exposure spot of a DNA chip, and a relation [****] It detects in respect of image formation, and an inspected DNA chip is inspected from the location and the reinforcement of fluorescence. At this time, the above-mentioned diameter of a spot is set to about $1/N$ to the integer N of the above-mentioned cel dimension. furthermore, the above-mentioned exposure spot location and the relative position of a DNA chip are differed j times one by one -- making -- all -- subject-of-examination location $LN_2=M_j$ is inspected. Moreover, N is made or more into two, a cel is divided into two or more parts, and exact inspection is conducted by choosing and processing only significant data among the data of two N in 1 cel. By doing in this way, fluorescence detection is carried out by the time amount within a $LN_2/(6 \times 10^5)$ second to all the subject-of-examination sample mark LN_2 of a DNA chip.

[0008] two or more [to the above-mentioned DNA chip] -- it has an exposure spot to the DNA chip of M , and a relation [****] The light-receiving opening concerned outside removes the noise light from other than an exposure spot or an exposure spot side, and having light-receiving opening of M individual which has an effective diameter almost comparable as an exposure spot image in respect of image formation, is conducting high inspection of a signal-to-noise ratio by shading and detecting each light which penetrated the light-receiving opening concerned. Moreover, M light-receiving openings which have an effective diameter almost comparable as the above-mentioned exposure spot image are optical fiber light-receiving edges, and are performing big detection of a signal-to-noise ratio further by detecting the light which carries out outgoing radiation from the outgoing radiation edge of this fiber.

[0009] two or more [to the above-mentioned DNA chip] -- the exposure spot of M -- the diameter d of a spot, and an integer k -- receiving -- about -- it arranges on a straight line with spacing of kd , and after the above-mentioned Δt hour exposure, only about d moves in the direction of an array, and irradiates this spot array for Δt hours. By repeating this actuation k times successively, it inspects covering the direction of an array in the spot location of kM individual, and the two-dimensional field of a request of a DNA chip is inspected by moving a DNA chip and test equipment in an array and the direction of a right angle relatively at least. Moreover, it is characterized by performing migration of the above-mentioned spot array using a sound optical deflector. Moreover, as for an integer k , it is desirable that it is two or more, and it is still still more advantageous in it being five or more on a ****-proof [signal] ratio. [of k]

[0010] The above-mentioned spot array is formed by the micro-lens array. Moreover, the above-mentioned spot array can also be formed by the hologram. the fluorescence which was synchronized with migration of the direction of an array of the above-mentioned spot array, and was produced by excitation light -- the above-mentioned light-receiving opening top -- a fluorescence detection deflection means is established in a fluorescence detection optical path so that it may come to the same part mostly. Under the present circumstances, the above-mentioned fluorescence detection deflection means uses the deflection means which used the piezoelectric device. Moreover, the above-mentioned fluorescence detection deflection means makes excitation light penetrate, and can be efficiently detected by carrying out configuration ** by the wavelength selection beam splitter in which fluorescence is reflected. Moreover, in order to improve separation with excitation light, only fluorescence is penetrated in the fluorescence detection optical path separated from the excitation optical path, and the filter which shades excitation light is used.

[0011] It constitutes so that the excitation light concerned which it is made for the M above-mentioned multi-excitation spot light to pass through the same location A mostly on the pupil of the above-mentioned objective lens, and they reflected regularly by the DNA chip may reach location B' on the pupil of an objective lens. Thus, the excitation light used as a noise component is removed from a fluorescence detecting signal by giving a means to be in the location of B' on the pupil of an objective lens, or a fluorescence detection optical path, and to shade reflective excitation light to the pupil of the above-mentioned objective lens, and the image position of B' on a field [****].

[0012] Moreover, it constitutes so that it may pass through the location B where the excitation light concerned which the M above-mentioned multi-excitation spot light passed through the same location A mostly on the pupil of the above-mentioned objective lens, and reflected regularly by the DNA chip differs from the above A on the pupil of an objective lens. Thus, the pupil of an objective lens or the member which shades the reflective excitation light of the pupil of an objective lens and the path of a request in a location [****] centering on B within a fluorescence detection optical path is arranged. Thus, the excitation light used as a noise component is removed from a fluorescence detecting signal.

[0013] Furthermore, the above-mentioned reflective excitation light which carries out protection from light is made into specular reflection excitation light, and as the excitation light scattered about from the foreign matter in a DNA chip penetrates from the outside of the above-mentioned protection-from-light means or a protection-from-light member, it takes out, and the taken-out scattered light is branched from the above-mentioned fluorescence detection optical path, and it picturizes in the exposure spot of a DNA chip, and a location [****], and detects. The fluorescence information detected with the above-mentioned fluorescence detection means is amended using the image pick-up information on the image of the detected scattered light. By doing in this way, the effect of the scattered light from the foreign matter which exists in a DNA chip is eliminated, and exact detection is attained.

[0014] The M above-mentioned multi-excitation spot light is formed by the laser light source. A strong large excitation exposure is realized at a minute spot by doing in this way. Moreover, by forming M multi-excitation spot light according to two or more semiconductor laser light sources, a bigger excitation exposure is realized by the small mounting volume. Under the present circumstances, the light which carried out outgoing radiation from two or more above-mentioned semiconductor laser light sources is introduced into an optical fiber, and it is made the configuration which carries out outgoing radiation from the outgoing radiation edge of the optical fiber concerned which aligned in the pitch of M requests. thus, it becomes possible by carrying out to obtain the multi-excitation spot light of M individual which is a desired pitch array.

[0015] Using the two-dimensional image pick-up equipment which consists of the $N_{xx}N_y$ pixel number of super-high sensitivity as a lightwave signal are recording mold image pick-up means, n_x and n_y are made into an integer, $n_x d$ is irradiated in the x directions and the excitation light of the diameter d of a spot is irradiated in the pitch of $n_y d$ in the direction of y at $N_{xx}N_y$ spot coincidence. Thus, super-high sensitivity two-dimensional image pick-up equipment detects the fluorescence spot image which consists of $N_{xx}N_y$ obtained, and $n_x n_y$ step migration of the relative position of detection equipment and a DNA chip is carried out in the xy direction in a pitch d . It becomes possible by doing in this way to detect the field of a request of a DNA chip.

[0016] Moreover, the above-mentioned excitation light consists of wavelength from which plurality differs, and separates and detects a different target which added two or more fluorescent substances. Furthermore, the excitation light which consists of two or more above-mentioned wavelength is irradiated at coincidence, a different target which added two or more fluorescent substances is separated, and it detects to coincidence. It becomes possible by doing in this way to perform the various candidates for detection at a high speed.

[0017] Focal detection is carried out by detecting the location of light which was made to shoot the 2nd light slanting ON near the above-mentioned excitation spot light, and was reflected by this control surface on the control surface which carried out hybridization of the target which added the fluorescent substance of a request of the above-mentioned inspected DNA chip. It becomes possible by controlling the relative distance of a control surface and the above-mentioned objective lens based on this detection information to perform focusing. Moreover, focal detection and control are attained with an easy configuration by constituting so that the light which the above 2nd makes put slanting ON may pass an objective lens.

[0018] Light which the above 2nd makes put slanting ON is made S polarization to a detection side. By doing in this way, the reflection factor in respect of fluorescence detection is raised, and right focal detection is attained. Furthermore, the light which the above 2nd makes put slanting ON uses the wavelength which does not excite the above-mentioned fluorescent substance. Exact detection is

attained by doing in this way, without making a noise superimpose on a fluorescence detecting signal. [0019]

[Embodiment of the Invention] Drawing 1 is drawing showing the operation gestalt of this invention. 1 is multispot excitation light illuminating system which carries out multispot excitation light formation and irradiates DNA chip 2 for fluorescence detection, and 3 is a fluorescence detection system which detects the fluorescence generated with multispot excitation light. 11 is the excitation light light source and the excitation light source including the beam shaping optical system of excitation light. A helium-Ne laser beam is fabricated by two cylindrical lenses from which a focal distance differs to a desired in-every-direction beam diameter ratio, and incidence is carried out to AO deflecting system via a mirror 1000. There are a high-frequency-voltage terminal of the frequency omega impressed to a quartz resonator and an input terminal of amplitude signal omegaV lower than this frequency in AO deflecting system.

[0020] The signal of the frequency omega sent from a control circuit 4 has the frequency band of the range of omega**omega 0. If a frequency changes, the angle of diffraction of the excitation light which carries out incidence will change to AO deflecting system. Moreover, since diffraction efficiency will change if amplitude signal omegaV is inputted from a control circuit 4, the reinforcement of the diffracted light is controllable. It dissociates with zero-order light (not shown) (zero-order light is shaded), and the diffracted light which passed along AO deflecting system irradiates the micro-lens array 14 by the desired beam system according to the lens system 13 which consists of two lenses 131 and 132 of focal distances f1 and f2. If the frequency of AO polariscope is changed, an include angle will change without the location of the excitation light which carries out incidence to the micro-lens array 14 changing.

[0021] Drawing 4 is the enlarged detail of the micro-lens array 14. 1010 which shows the light which many minute micro lenses made with glass are located in a line in the shape of [32-256]-dimensional [1], and carried out incidence here as a continuous line penetrates a micro lens, penetrates each micro-lens 141,142, and is the minute spot 111,112 on the straight line L on a focal plane sigma.. 11M are connected. When the frequency of AO deflecting system is changed, as the dotted line of drawing 4 shows, the include angle of the excitation light which carries out incidence to a micro lens changes, and the location of the minute spot on a straight line L is 1j21 and 1j22.... It changes to the appearance which is 1j2M.

[0022] Minute spot array 111,112 made on the focal plane sigma of the micro-lens array 14 11M irradiate and excite the fluorescent substance added to the target to which hybridization of DNA chip 2 was carried out with the lens 15 and the objective lens 16 as shown in drawing 1 . The focus of an objective lens 16 is made so that it may become the minimum beam diameter in glass side [with this target] sigma 1, or sigma 2 (in detail refer to drawing 33) top.

[0023] Drawing 2 shows the detail of the plane structure of DNA chip 2. The smallest unit 201,211,202,212 grade of the square shown by the thin line in every direction expresses a detection picture element. By a diagram, the amount of [of 5x5] picture element (a thick line shows) is a cel 20. The fragment of the same DNA information is planted in one cel. Therefore, the target which has the same DNA fragment structure in this cel is hybridized.

[0024] Thus, while the protein which is a foreign matter is mixing in one cel, that the fluorescence of big reinforcement occurs produces the reason for dividing one cel by two or more picture elements by the excitation light which carried out incidence to this protein. Usually, since the dimension of such a foreign matter is several [at most] micrometers, a picture element dimension is several micrometers, and if it can detect and dissociate by approach which the foreign matter location in a 10-micrometer cel will mention later if 10 micrometers of dimensions of a cel become, for example, it will become possible to ask for the magnitude of fluorescence correctly using information other than a foreign matter part.

[0025] Drawing 3 is the side elevation of a DNA chip. With this picture, the target hybridized has the structure of being on the glass substrate naked. It may be inserted between glass substrates so that it may be such and may mention later. Anyway, a minute excitation light spot is condensed by the field with a target. This diameter of condensing is almost equal to the dimension of the picture element of the

detection which is the square smallest unit shown by drawing 2 .

[0026] As the diffracted light shown as the continuous line of drawing 1 in the frequency in early stages of AO deflecting system is obtained and it is shown in drawing 3 at this time, an excitation light spot array is the picture element 201,202,203 on a DNA chip like 101,102,103 to a DNA chip.. 20M irradiate, and the fluorescence of each picture element is detected so that it may mention later. The irradiation time of this excitation light is time amount deltat beyond the fluorescence damping time (number - hundreds of microseconds), and is 60 microseconds in this example of an operation gestalt.

[0027] After 60-microsecond progress, if the frequency of AO deflecting system is changed, the angle of diffraction of excitation light will change, as drawing 1 and drawing 4 show, the light of 10j20 shown by the dotted line carries out incidence to a micro-lens array, and in the DNA chip of drawing 3 , it is 111,112,113.... An excitation light spot array is irradiated like 11M, and it is 211,212,213.. The fluorescence which is the picture element which is 21M is detected. Thus, when it shifts a picture element pitch every, and a sequential exposure is carried out and M multisots shift by j picture element, parts for all jM picture element will be detected.

[0028] Next, drawing 1 explains the operation gestalt of fluorescence detection. The beam splitter 30 between a lens 15 and an objective lens 16 is a wavelength separation beam splitter. The wavelength of the excitation light source HE-Ne laser used with this operation gestalt is 633nm, and the fluorescent substance added to the target on a chip is Cy5. The wavelength of the fluorescence to detect is nearly 670nm.

[0029] The wavelength separation beam splitter 30 penetrates incident light about 100% 45 degrees in 633nm, and 670nm fluorescence is about 100% reflection in 45-degree incidence. However, no less than 633nm reflects very only. Since fluorescence is very feeble, this very slight reflection also poses a problem. So, with the operation gestalt of drawing 1 , it has a main wavelength property in 670nm, the interference filter 34 whose anti-range of prices is about 15nm is inserted in the fluorescence detection system 3, and the leakage of excitation light is shaded with this interference filter. In addition, 34 is not limited to an interference filter, more than a certain wavelength may penetrate, and the following may use the so-called color filter which shades. Moreover, you may use combining a color filter and an interference filter. In explanation of subsequent operation gestalten, since explanation is brief, only an interference filter explains.

[0030] Next, amendment of change of the location of a detection fluorescence image when changing the location on the DNA chip of multisot excitation light using AO deflecting system and said location change with the need detected with the detector of immobilization of carrying out for accumulating is explained. The wavelength separation beam splitter 30 of drawing 1 is also performing amendment of this location change. Drawing 5 shows the main parts of drawing 1, and the same number as drawing 1 expresses the same object. The wavelength separation beam splitter 30 is driven by the piezo-electric element 301 with the high resonance frequency property of 5-10kHz, and has minute rotation structure centering on the y-axis.

[0031] Drawing 6 and drawing 7 are drawings having shown the role of this minute rotation, and the same number as drawing 1 expresses the same object. The multi-excitation minute spots 1011 and 1021 on DNA chip 2 of drawing 6 (C), , each location of 10M1 make one picture element carry out sequential change at a time with 1012, 1022, ..., 10M2 with the deviation signal inputted into the AO deflecting system 12 from a control circuit 4. As shown in drawing 6 (D) at this time, supposing the wavelength separation beam splitter 30 does not rotate, the multi-fluorescence points 1211 and 1221 on fluorescence detection side sigmaPH in a DNA chip and a location [****], , 12M1 [one-picture element] will change at a time to 1212, 1222, ..., 12M2 too.

[0032] As shown in drawing, 1212 points carry out image formation of the fluorescence spot image 1212 on a fluorescence detection side to one fiber edge of an optical fiber bundle 322 by the micro-lens array 321 for fluorescence detection, and it carries out incidence to a fiber. One optical fiber consists of the heart 3221 along which light passes, and the part 3222 which protects it. The path of the heart along which light passes is a little larger than the fluorescence (multi) point 1211 on fluorescence detection side sigmaPH. If the wavelength separation beam splitter 30 does not rotate, 1211 points move with

1212, 1213, 1214, and by the drive of AO deflecting system, and it shifts from the fiber incidence edge and it will become impossible however, to detect. By the piezo-electric element 301 with a high resonance frequency [there] property, as shown in drawing 7, the minute rotation drive of the wavelength separation beam splitter 30 is carried out.

[0033] namely, by drawing 6 when not carrying out minute rotation, by carrying out minute rotation shows within the limit of the dotted line of drawing 7 to having moved to the locations 1212, 1213, and 1214 where the fluorescence minute spot images 1211 differ -- as -- sigmaPH top -- a spot comes to the same location mostly.

[0034] Drawing 8 ON-OFF of the AO deflecting system 12 explained above or the modulating signal SA 12 on the strength, the driving signal S30 of the piezo-electric element 301 which similarly carries out the deviation drive of the deviation signal SB 12 and the wavelength separation beam splitter 30 of AO deflecting system, and a fiber 32 are minded.

* NOTICES *

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] To the DNA chip which is the minute area which arranged the desired DNA fragment which consists of two or more classes based on the fixed regulation which was able to be decided beforehand and which consist of cel of L The excitation light which becomes the inspected DNA chip which carried out hybridization of the target which added the desired fluorescent substance to the DNA fragment created by pretreatment from DNA which is a subject of examination from desired wavelength is irradiated. Cover time amount Δt beyond the fluorescence damping time in a mutually different location, and the multispot excitation light of M is irradiated at coincidence using an objective lens. the DNA inspection approach of analyzing the fluorescence acquired -- two or more [which it is and is the diameter d of a spot below the dimension D of each above-mentioned cel] -- The DNA inspection approach of leading the fluorescence acquired to a fluorescence detection optical path, separating and detecting the fluorescence from each multispot light generated by the multispot excitation light to the above-mentioned DNA chip, and inspecting an inspected DNA chip from the location and reinforcement of fluorescence.

[Claim 2] The excitation light spot of M is the DNA inspection approach according to claim 1 characterized by having arranged on a straight line at constant pitch-dimensional [1] or in the shape of two-dimensional two or more.

[Claim 3] The above-mentioned diameter of a spot is the DNA inspection approach according to claim 1 characterized by being about $1/N$ to the integer N of the above-mentioned cel dimension.

[Claim 4] The DNA inspection approach according to claim 3 which makes Above N two or more and is characterized by conducting exact inspection by choosing and processing only significant data among the data of two N which divides a cel into two or more parts, and is in 1 cel.

[Claim 5] The DNA inspection approach given in claim 1 thru/or any of 4 they are. [which is characterized by carrying out fluorescence detection by the time amount within a $LN^2/(6 \times 10^5)$ second to all the subject-of-examination sample mark LN^2 of a DNA chip]

[Claim 6] It arranges on a straight line with spacing of kd . two or more [to the above-mentioned DNA chip] -- the exposure spot of M -- the diameter d of a spot, and an integer k -- receiving -- about -- Only after the above-mentioned Δt hour exposure and about d moving the spot array concerned in the direction of an array, and irradiating for Δt hours by repeating k times successively The DNA inspection approach according to claim 1 characterized by inspecting covering the direction of an array in the spot location of kM individual, and inspecting the two-dimensional field of a request of a DNA chip by moving a DNA chip and an objective lens in an array and the direction of a right angle relatively at least.

[Claim 7] The above-mentioned integer k is the DNA inspection approach according to claim 6 characterized by being two or more.

[Claim 8] The above-mentioned integer k is the DNA inspection approach according to claim 6 characterized by being five or more.

[Claim 9] The DNA inspection approach given [the fluorescence which was synchronized with

migration of the direction of an array of the above-mentioned spot array, and was produced by excitation light] in any of claims 1, 6, 7, and 8 on the above-mentioned light-receiving opening which possess a fluorescence detection deflection means in a fluorescence detection optical path so that it may come to the same part mostly they are.

[Claim 10] The above-mentioned fluorescence detection deflection means is the DNA inspection approach according to claim 9 characterized by consisting of wavelength selection beam splitters in which excitation light is made to penetrate and fluorescence is reflected.

[Claim 11] The DNA inspection approach given in claim 1 term characterized by having the filter which penetrates only fluorescence and shades excitation light in the fluorescence detection optical path separated from the excitation optical path.

[Claim 12] The M above-mentioned multi-excitation spot light passes through the same location A mostly on the pupil of the above-mentioned objective lens. It constitutes so that the excitation light concerned reflected regularly by the DNA chip may reach location B' on the pupil of an objective lens. The location of B' on the pupil of the objective lens concerned, or the DNA inspection approach according to claim 1 characterized by providing a means to be in a fluorescence detection optical path and to shade reflective excitation light to the pupil of the above-mentioned objective lens, and the image position of B' on a field [****].

[Claim 13] The M above-mentioned multi-excitation spot light passes through the same location A mostly on the pupil of the above-mentioned objective lens. the excitation light concerned reflected regularly by the DNA chip passes through a different location B from the above A on the pupil of an objective lens -- as -- constituting -- the pupil of the objective lens concerned -- or The DNA inspection approach according to claim 1 characterized by arranging the member which shades the reflective excitation light of the pupil of an objective lens, and the path of a request in a location [****] centering on B within a fluorescence detection optical path.

[Claim 14] The excitation light which the above-mentioned reflective excitation light is specular reflection excitation light, and was scattered about from the foreign matter in a DNA chip is taken out from the outside of the above-mentioned protection-from-light means or a protection-from-light member. Furthermore, branch from the above-mentioned fluorescence detection optical path, and it picturizes in the exposure spot of a DNA chip, and a location [****]. The DNA inspection approach given in any of claims 12 or 13 characterized by amending the information which separated and detected the fluorescence from each multispot light generated by the above-mentioned multispot excitation light using the image pick-up information concerned they are.

[Claim 15]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] Drawing showing the operation gestalt of this invention.

[Drawing 2] A multispot exposure is expressed in the operation gestalt Fig. of this invention.

[Drawing 3] Migration of a multispot exposure is expressed in the operation gestalt Fig. of this invention.

[Drawing 4] In the operation gestalt Fig. of this invention, multispot generating by the micro-lens array is expressed.

[Drawing 5] Drawing which explains the operation gestalt of drawing 1 in the operation gestalt Fig. of this invention.

[Drawing 6] Drawing explaining a motion of the spot fluorescence image at the time of wavelength selection beam splitter immobilization.

[Drawing 7] Drawing explaining a motion of the spot fluorescence image at the time of a wavelength selection beam splitter deviation

[Drawing 8] Drawing which this invention carries out an operation gestalt and expresses actuation of each part article of drawing 1 , a detecting signal, etc.

[Drawing 9] Drawing which expresses a motion of the image of a fluorescence image detection side with the operation gestalt of drawing 1 .

[Drawing 10] Drawing which expresses light-receiving opening of a fluorescence detection side with the operation gestalt of drawing 1 .

[Drawing 11] Drawing which forms multispot by the hologram in the operation gestalt Fig. of this invention.

[Drawing 12] Drawing showing how to create the above-mentioned hologram.

[Drawing 13] Drawing showing the operation gestalt of this invention.

[Drawing 14] Micro RENZUARE for two-dimensional multispot generating used with the operation gestalt of drawing 13 .

[Drawing 15] Drawing showing the property of a wavelength separation beam splitter with the operation gestalt of this invention.

[Drawing 16] Drawing showing the property of an interference filter with the operation gestalt of this invention.

[Drawing 17] Drawing which shades excitation light with a spatial filter in the operation gestalt Fig. of this invention.

[Drawing 18] Drawing of the above-mentioned spatial filter.

[Drawing 19] Drawing showing the excitation light shading method for using a deviation in the operation gestalt Fig. of this invention.

[Drawing 20] Drawing which detects a 1-dimensional spot array by two-dimensional multichannel photograph mull in the operation gestalt Fig. of this invention.

[Drawing 21] Drawing showing the close outgoing radiation edge of a fiber, and spot image incorporation with the operation gestalt of above-mentioned drawing 20 .

[Drawing 22] Drawing which makes excitation light two or more wavelength, and detects it in the operation gestalt Fig. of this invention.

[Drawing 23] Drawing which uses two or more semiconductor laser for excitation light in the operation gestalt Fig. of this invention.

[Drawing 24] Drawing which obtains multispot light from the outgoing radiation edge of a fiber in the operation gestalt Fig. of this invention.

[Drawing 25] Drawing which obtains multispot from one laser beam in the operation gestalt Fig. of this invention.

[Drawing 26] Drawing which makes excitation light two or more wavelength, and is detected to coincidence in the operation gestalt Fig. of this invention.

[Drawing 27] Drawing which carries out the slanting exposure of the multispot light in the operation gestalt Fig. of this invention, and shades specular reflection excitation light on a pupil.

[Drawing 28] Drawing showing the protection-from-light section on the pupil of above-mentioned drawing 27 .

[Drawing 29] Drawing showing how to detect the excitation scattered light, ask for a foreign matter location, and amend a fluorescence detection result in the operation gestalt Fig. of this invention.

[Drawing 30] Drawing showing the excitation specular reflection light and dispersion excitation light between the objective lens of above-mentioned drawing 29 , and a DNA chip.

[Drawing 31] Drawing showing the approach of amendment by the detecting signal of the foreign matter scattered light of drawing 29 .

[Drawing 32] Drawing showing control with focal detection in the operation gestalt Fig. of this invention.

[Drawing 33] Drawing showing reflective concord of a DNA chip by focal detection of drawing 32 .

[Drawing 34] Drawing which carries out focal detection through an objective lens in the operation gestalt Fig. of this invention.

[Drawing 35] Drawing showing how to detect all the regions of a DNA chip to be examined, with the operation gestalt of this invention.

[Drawing 36] The expansion explanatory view of the operation gestalt of drawing 35

[Drawing 37] The expansion explanatory view of the operation gestalt of drawing 35

[Drawing 38] Drawing showing a motion of multispot with the operation gestalt of drawing 35 .

[Drawing 39] Drawing showing a motion of the x directions of a DNA chip chuck with the operation gestalt of drawing 35 .

[Drawing 40] Drawing showing a motion of the direction of y of a DNA chip chuck with the operation gestalt of drawing 35 .

[Description of Notations]

1 Excitation light exposure optical system, 10 Multispot formation optical system, 11 A light source system, 12 AO deflecting system, 14 Micro-lens array, 16 An objective lens, 14' Multispot generating hologram, 2 A DNA chip, 20 A cel, 201,202,212 Fluorescence detection picture element, 30 Wavelength selection beam splitter deflecting system, 300 Mirror deflecting system, 32 An optical fiber, 33 A photo multiplier, 4, 4' Control circuit, 41' An input terminal, 51, 52, 53, 54 Wavelength selection beam splitter, 7 a focal detection system and 73 the jogging device of an objective lens and a focal system, and 80 a DNA chip chuck, and 81 and 82 a DNA chip chuck location length measuring machine and 83 it is a DNA chip chuck drive.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

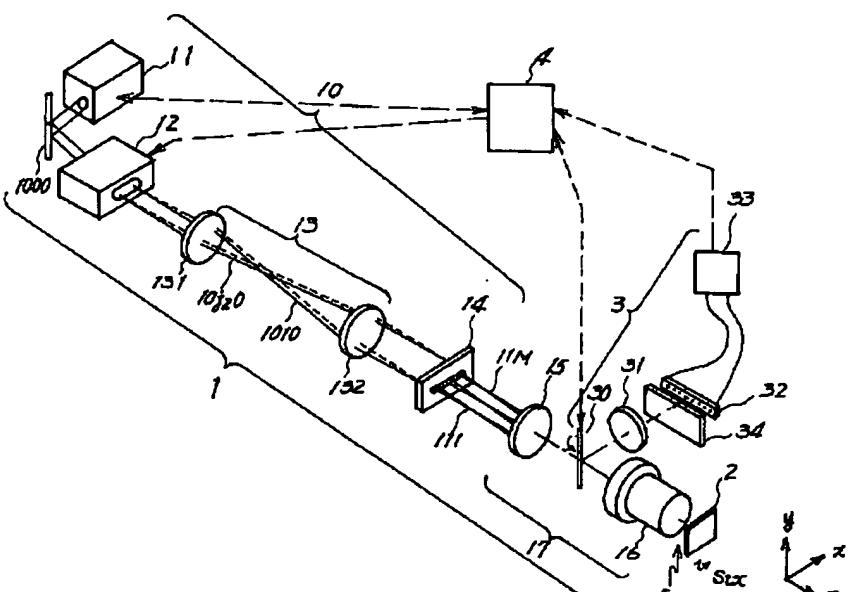
[Drawing 1] 

図 1

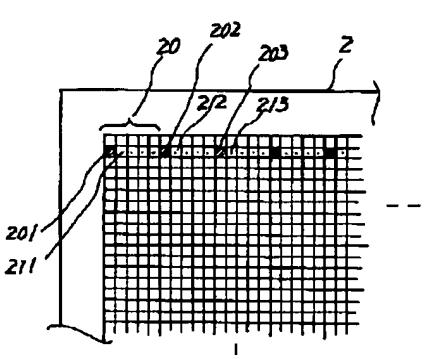
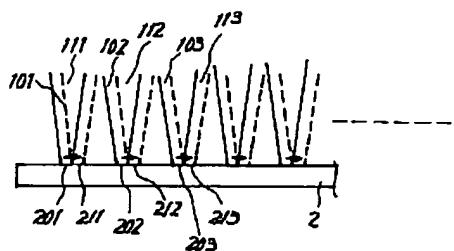
[Drawing 2] 

図 2

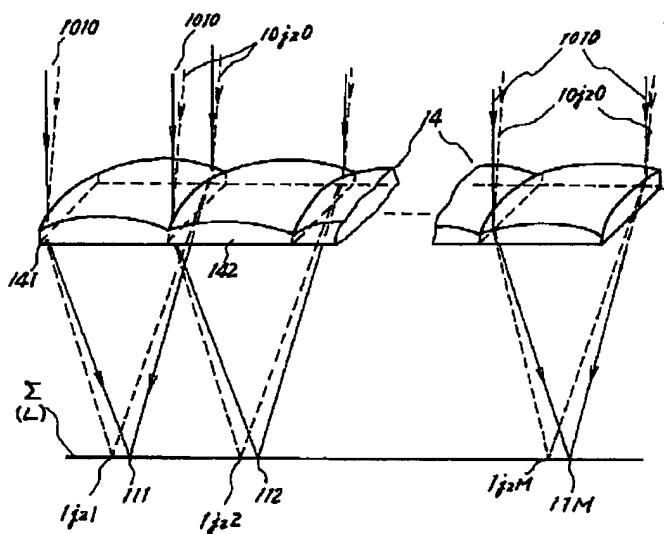
[Drawing 3]

図 3



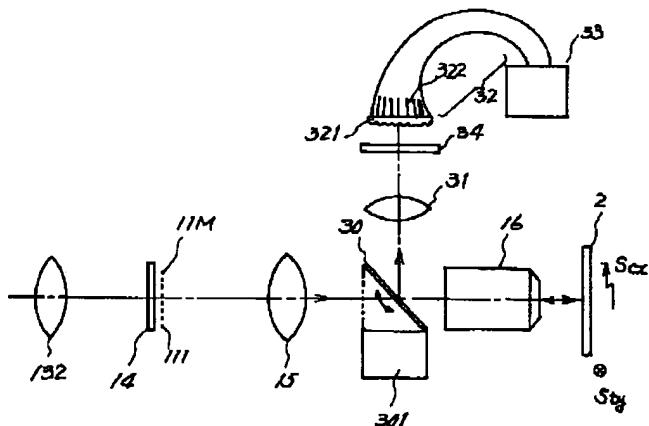
[Drawing 4]

図 4



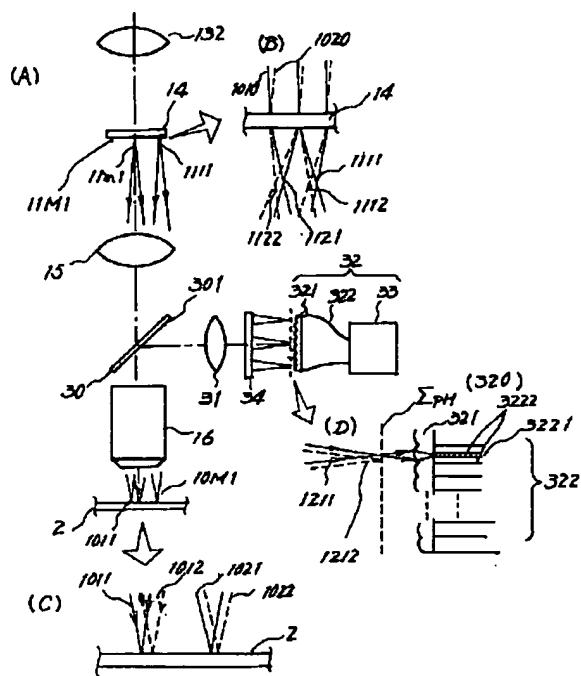
[Drawing 5]

図 5



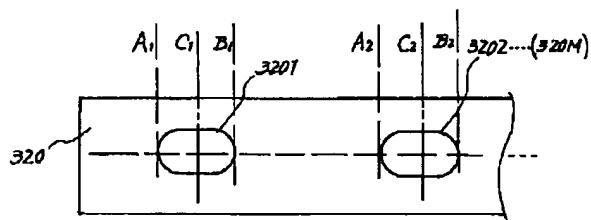
[Drawing 6]

図 6



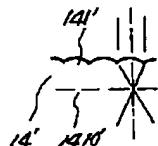
[Drawing 10]

図 10



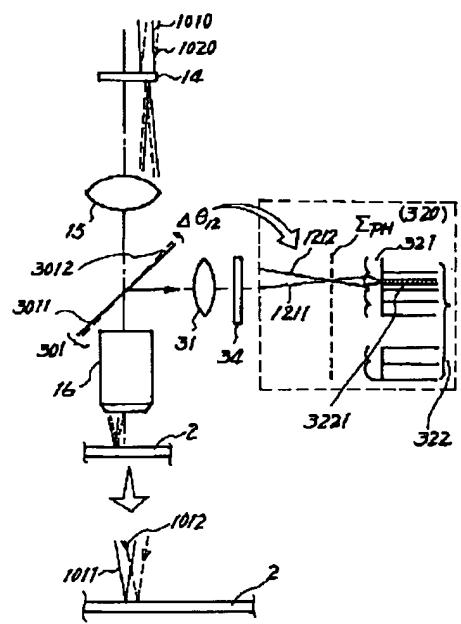
[Drawing 14]

図 14



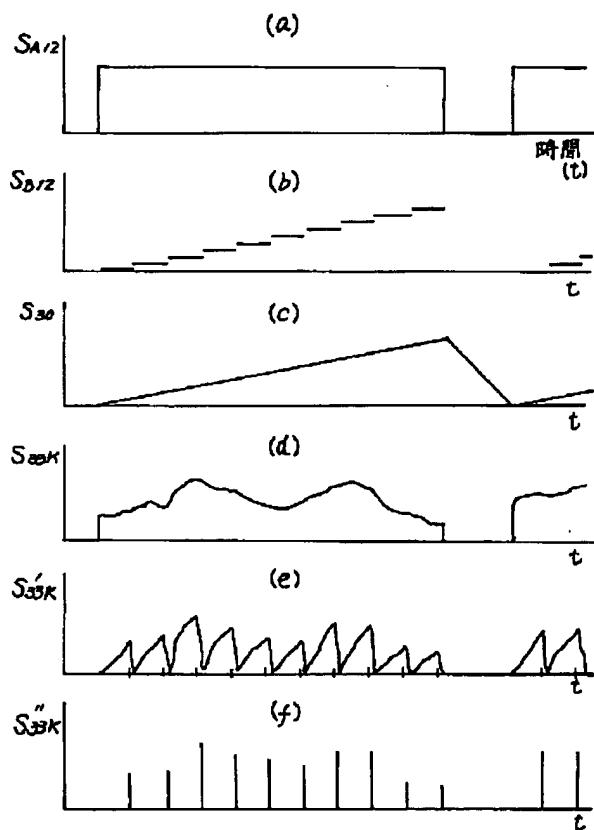
[Drawing 7]

図 7

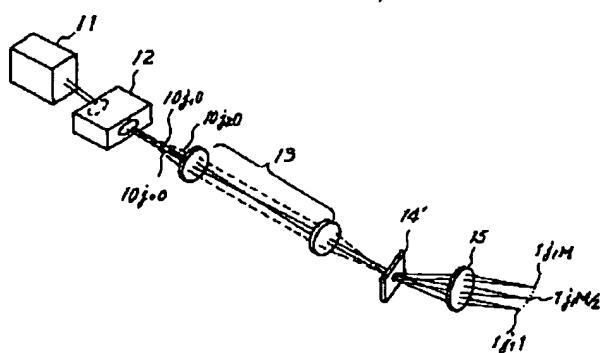


[Drawing 8]

図 8

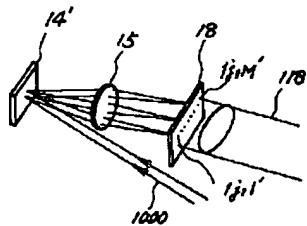


[Drawing 11]



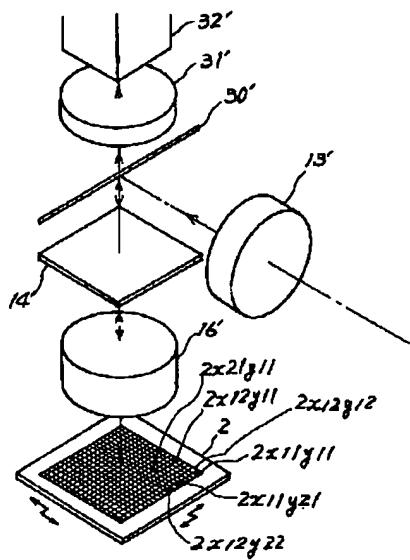
[Drawing 12]

图 12



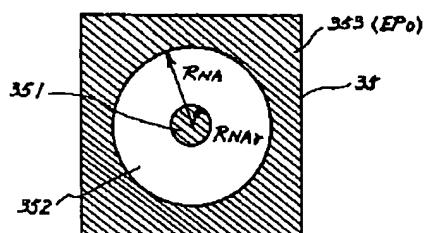
[Drawing 13]

图 13

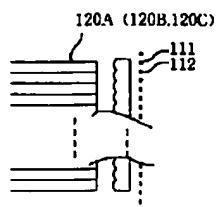


[Drawing 18]

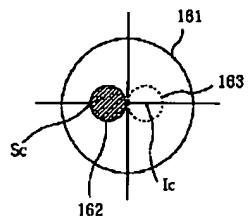
图 18



[Drawing 24]    **図 24**

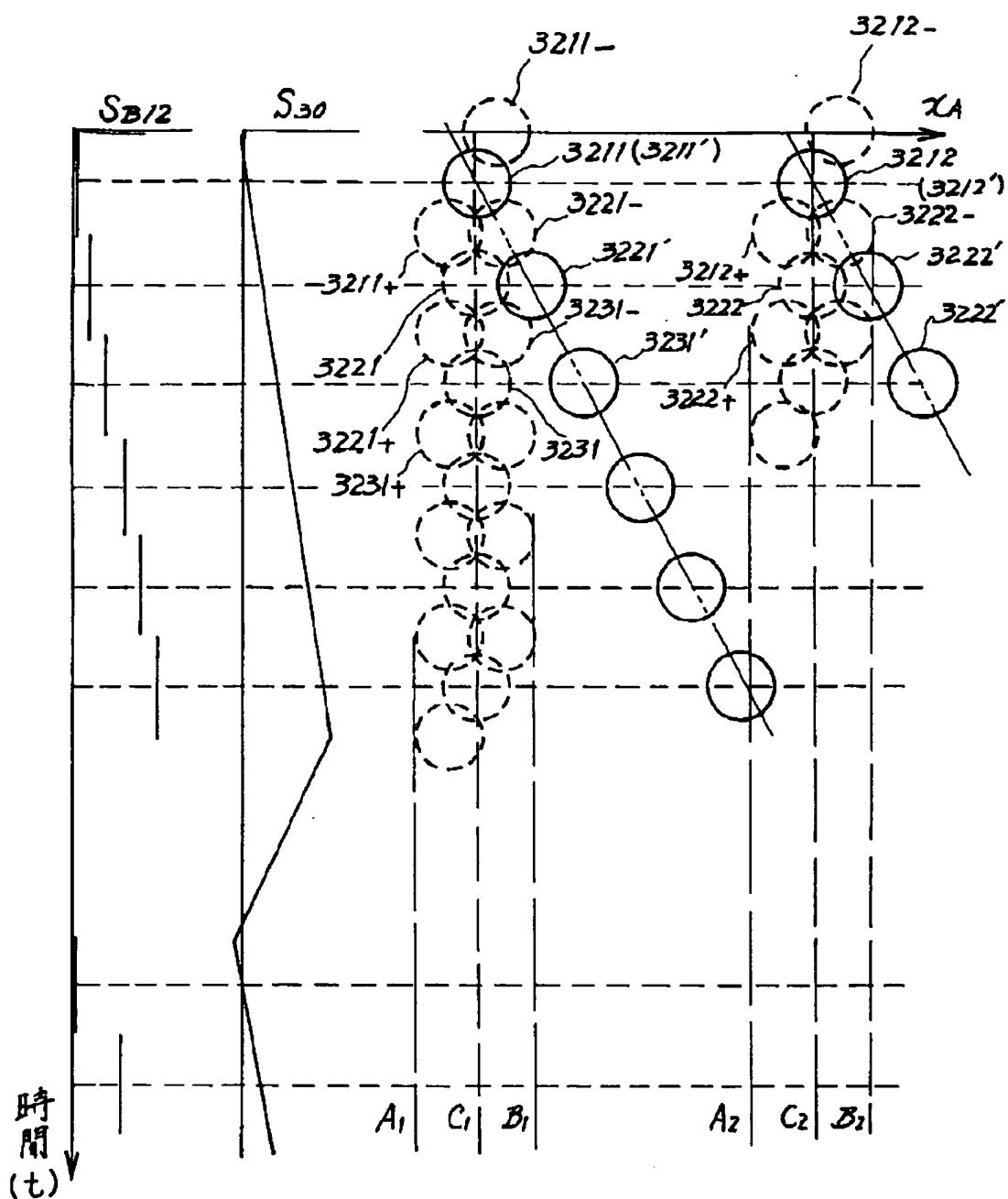


[Drawing 28]  **図 28**



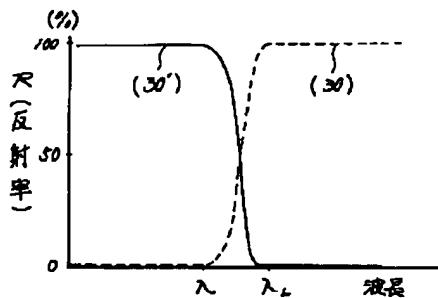
[Drawing 9]

図 9



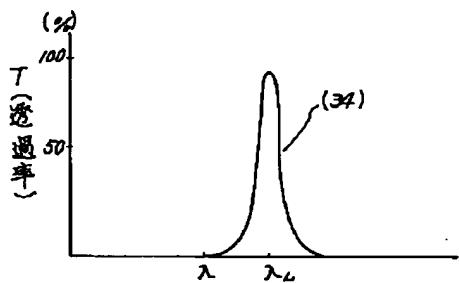
[Drawing 15]

図 15



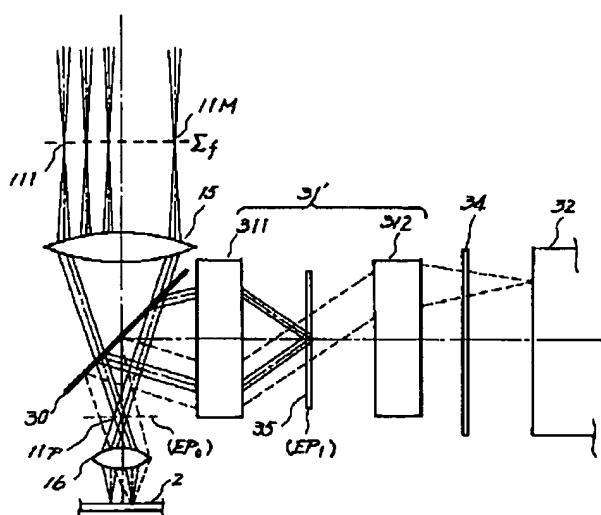
[Drawing 16]

図 16



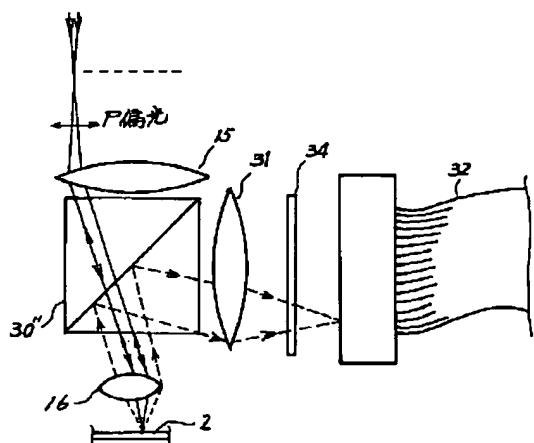
[Drawing 17]

図 17



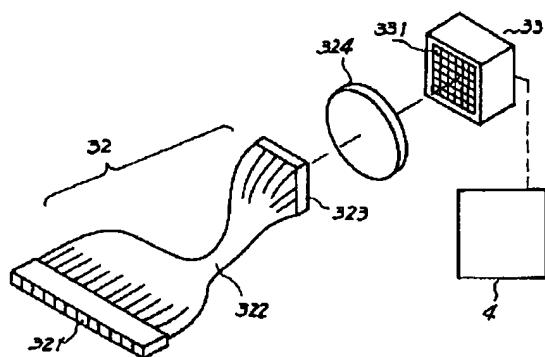
[Drawing 19]

図 19



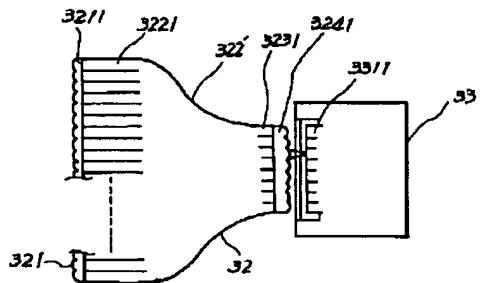
[Drawing 20]

図 20



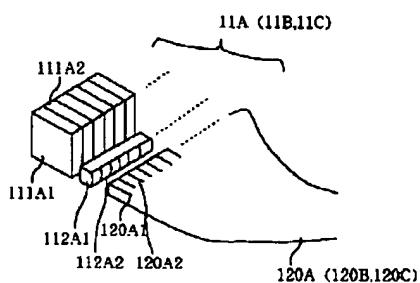
[Drawing 21]

図 21



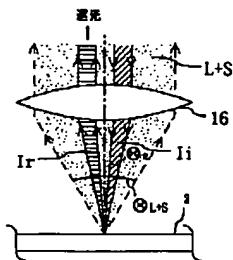
[Drawing 23]

図 23



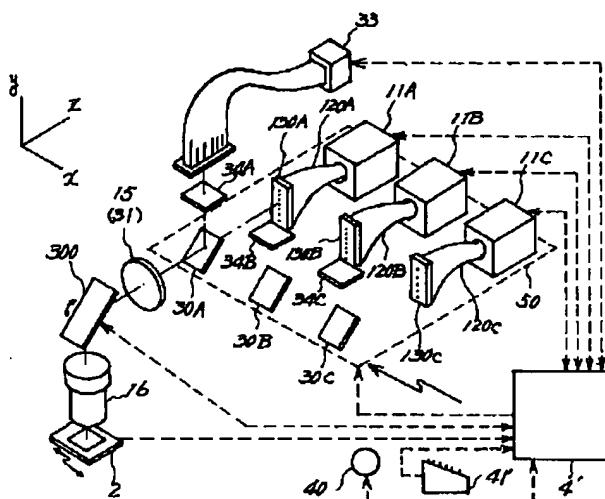
[Drawing 30]

30



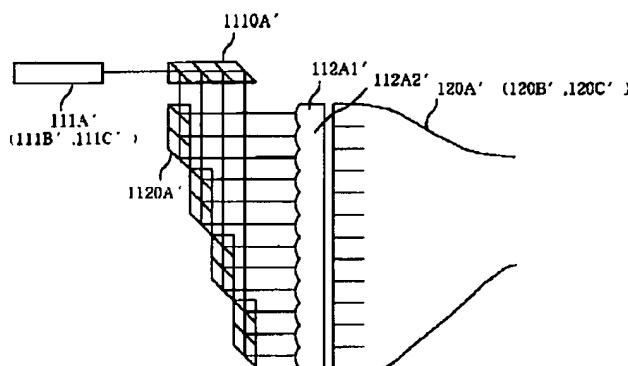
[Drawing 22]

圖 22



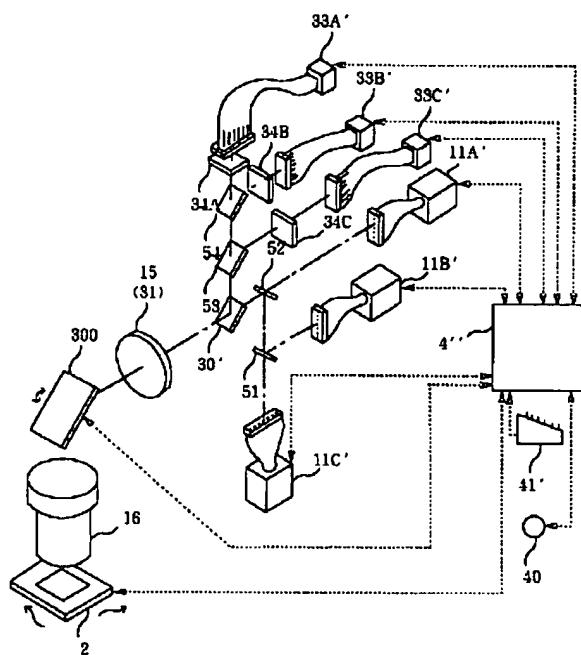
[Drawing 25]

图 25



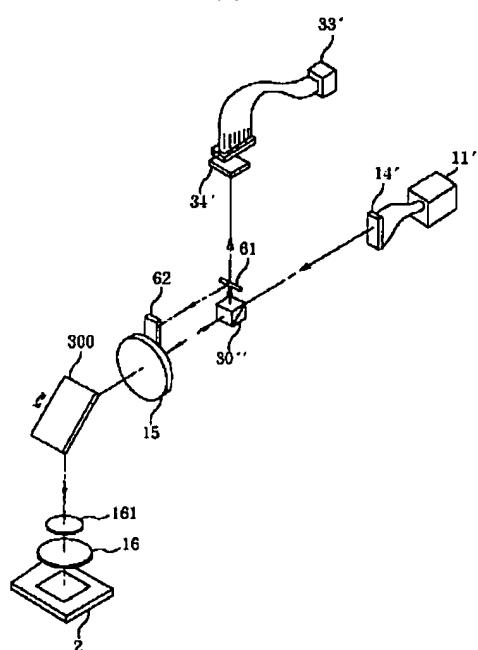
[Drawing 26]

図 26



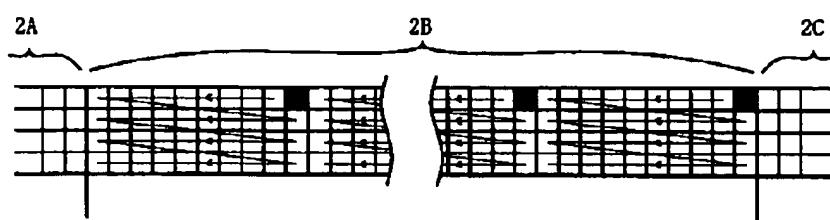
[Drawing 27]

図 27



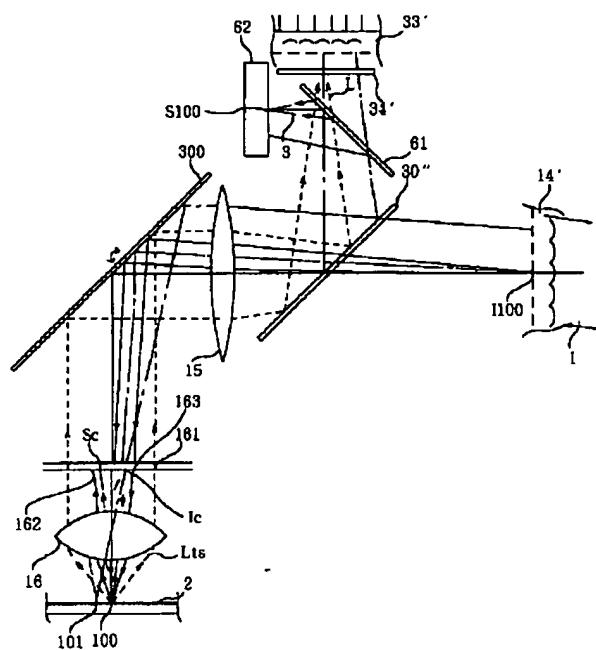
[Drawing 37]

図 37



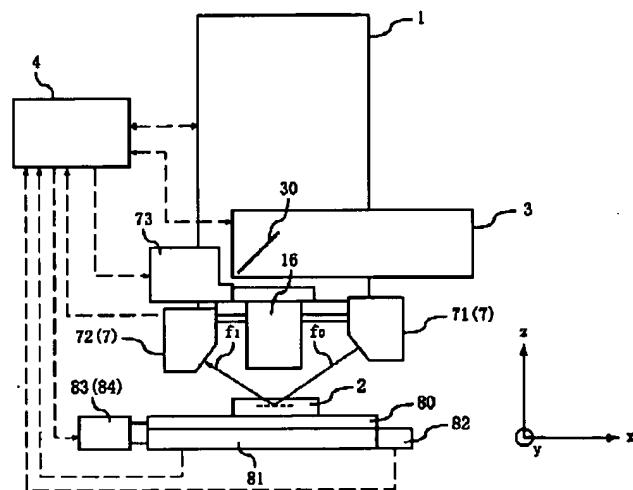
[Drawing 29]

図 29



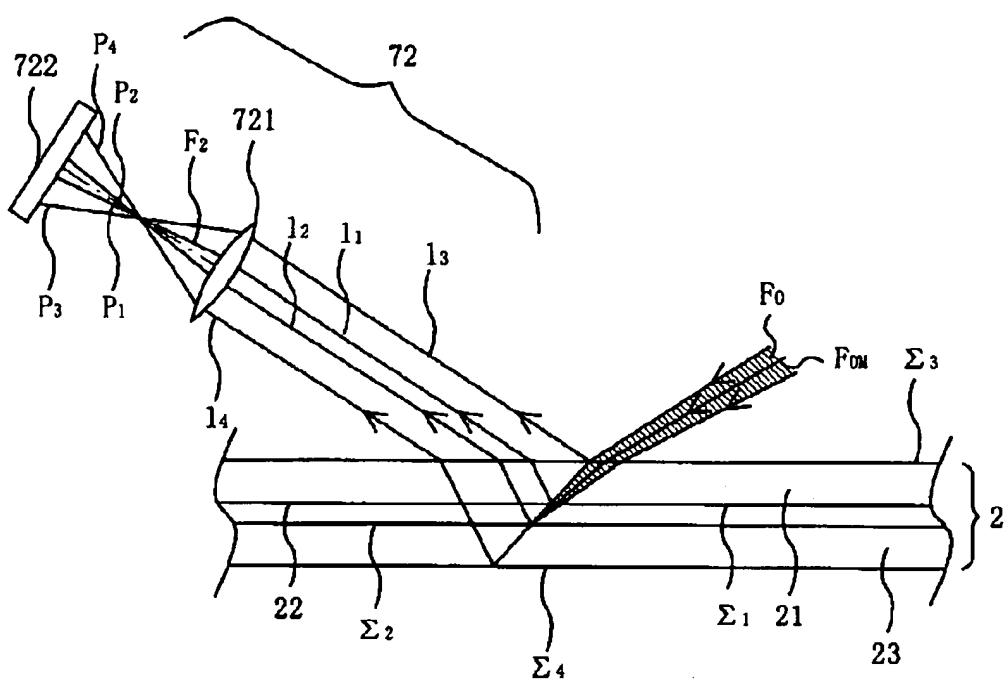
[Drawing 32]

図 32



[Drawing 33]

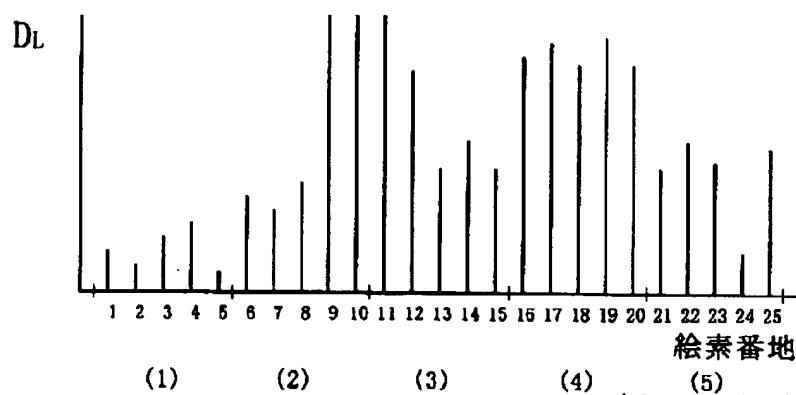
図 33



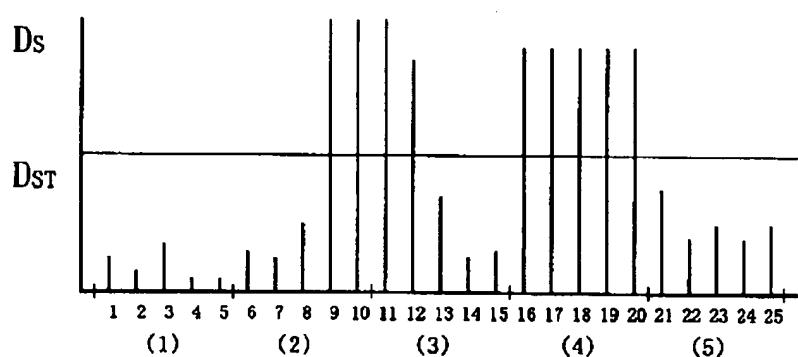
[Drawing 31]

図 31

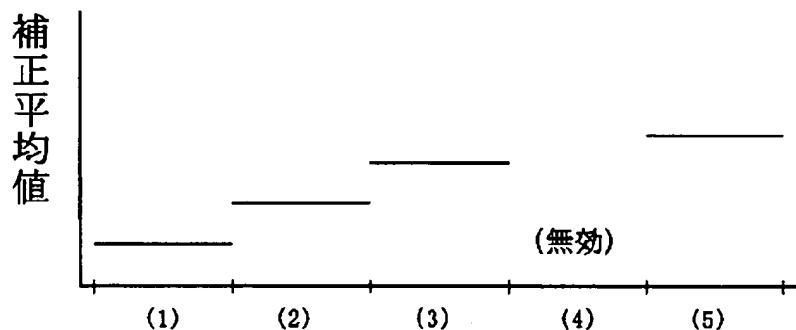
(a)



(b)



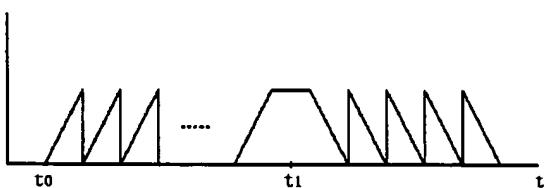
(c)



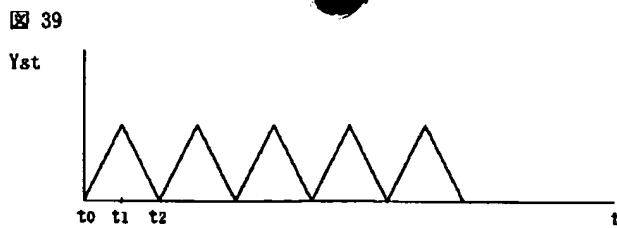
[Drawing 38]

図 38

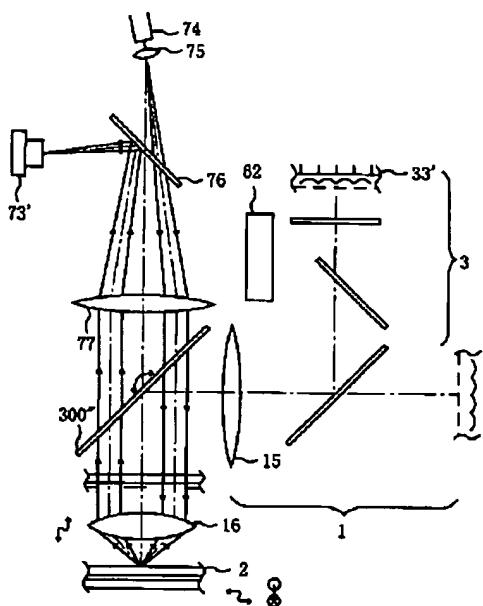
Spx



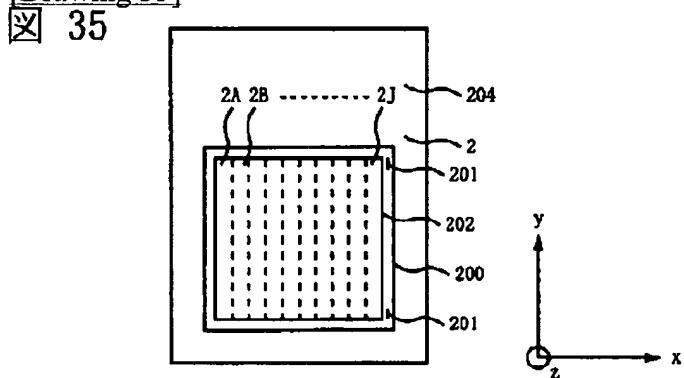
[Drawing 39]



[Drawing 34]
図 34

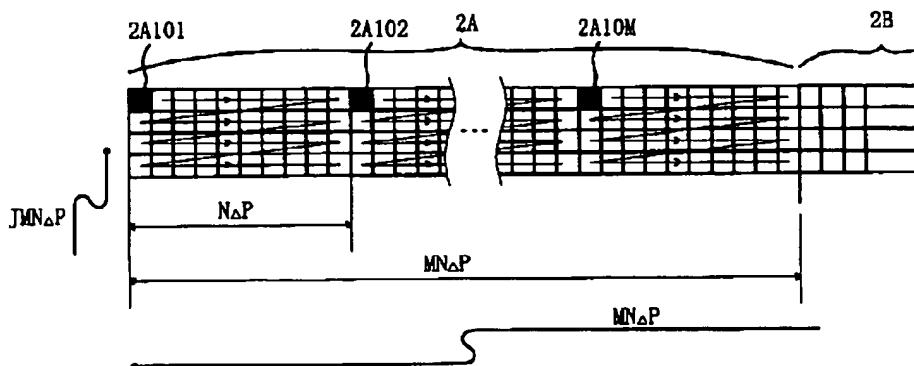


Drawing 35]



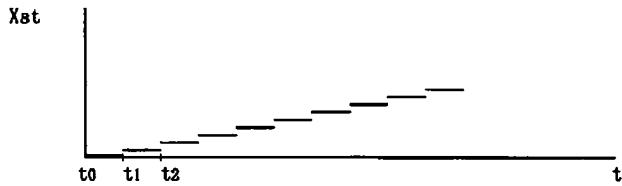
[Drawing 36]

図 36



[Drawing 40]

図 40



[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-108684

(P2001-108684A)

(43)公開日 平成13年4月20日 (2001.4.20)

(51)Int.Cl'	識別記号	P I	マーク(参考)
G 0 1 N 33/58	Z NA	G 0 1 N 33/58	Z N A A 2 G 0 4 3
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 2 G 0 4 5
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 21/64	F 4 B 0 2 9
G 0 1 N 21/64		33/50	P 4 B 0 8 9

審査請求 未請求 請求項の数46 O.L (全24頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平11-283926	(71)出願人	000005108 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地
(22)出願日	平成11年10月5日 (1999.10.5)	(72)発明者	押田 良忠 神奈川県横浜市戸塚区吉田町292番地 株式会社日立製作所生産技術研究所内
		(72)発明者	中田 俊彦 神奈川県横浜市戸塚区吉田町292番地 株式会社日立製作所生産技術研究所内
		(74)代理人	100075086 弁理士 作田 康夫

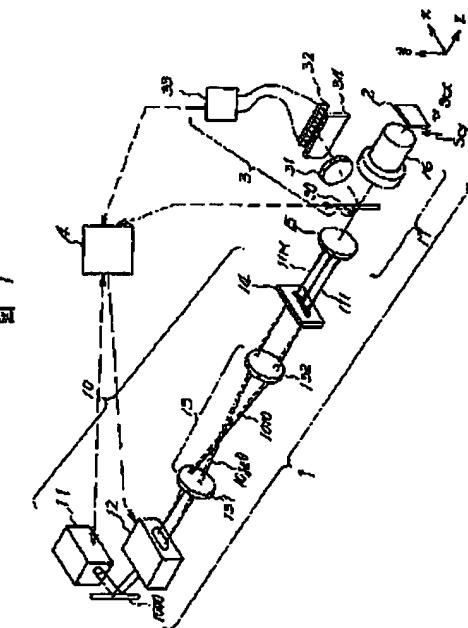
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 DNA検査方法及びDNA検査装置

(57)【要約】

【課題】1点ずつ検出する従来法では、多数のセルからなるDNAチップを高速検出できない。また異物の影響を除去することが難しく、検出したい元素寸法がDNAチップの場合小さくなり蛍光面に焦点を合わせる必要があるが従来困難であった。

【解決手段】DNAチップにマルチスポットアレイ光を同時に励起照射し、蛍光を同時に検出する。更にアレイ光をアレイ方向に移動すると共に少なくともアレイと直角な方向に検出系とチップを相対移動し、高速・正確に検査する。異物からの励起光散乱を検出し、蛍光検出結果を補正する。また蛍光面に第2の光を斜め照射し、反射光の位置検出から蛍光面にフォーカスを併せる。



(2)

特開2001-108684

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】複数の植類からなる所望のDNA断片を予め決められた一定の規則に基づき配列した微小エリアである複数Lのセルから構成されているDNAチップに、検査対象であるDNAから前処理により作成したDNA断片に所望の蛍光体を付加したターゲットをハイブリダイゼーションした被検査DNAチップに所望の波長からなる励起光を照射し、得られる蛍光を分析するDNA検査方法において、上記各セルの寸法D以下のスポット径dである複数Mのマルチスポット励起光を互いに異なる位置に蛍光減衰時間以上の時間△tに亘り対物レンズを用いて同時に照射し、得られる蛍光を蛍光検出光路に導き、上記DNAチップへのマルチスポット励起光により発生した各マルチスポット光からの蛍光を分離して検出し、蛍光の位置と強度から被検査DNAチップの検査を行うDNA検査方法。

【請求項2】複数Mの励起光スポットは1次元もしくは2次元状に一定ピッチで直線上に配列することを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

【請求項3】上記スポット径は上記セル寸法の整数Nに對しほぼ1/Nであることを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

【請求項4】上記Nを2以上にしセルを複数の部分に分割し、1セル内にあるN²個のデータの内有意なデータのみを選択し、処理することにより正確な検査を行うことを特徴とする請求項3記載のDNA検査方法。

【請求項5】DNAチップの全検査対象サンプル点数L N²に対し、L N² / (6 × 10⁶)秒以内の時間で蛍光検出することを特徴とする請求項1乃至4の何れかに記載のDNA検査方法。

【請求項6】上記DNAチップへの複数Mの照射スポットはスポット径d、整数kに対しほぼk dの間隔を持って直線上に配列し、当該スポットアレイを上記△t時間照射後、ほぼdだけアレイ方向に移動し、△t時間照射することを順次k回繰り返すことにより、アレイ方向にk M個のスポット位置に亘り検査を行い、かつDNAチップと対物レンズを少なくともアレイと直角方向に、相対的に移動することによりDNAチップの所望の2次元領域を検査することを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

【請求項7】上記整数kは2以上であることを特徴とする請求項6記載のDNA検査方法。

【請求項8】上記整数kは5以上であることを特徴とする請求項6記載のDNA検査方法。

【請求項9】上記スポットアレイのアレイ方向の移動と同期させ、励起光により生じた蛍光が上記受光開口上のはぼ同一箇所に来るよう蛍光検出光路内に蛍光検出偏向手段を具備した請求項1、6、7、8の何れかに記載のDNA検査方法。

【請求項10】上記蛍光検出偏向手段は励起光を透過さ

2

せ、蛍光を反射させる波長選択ピームスプリッタで構成されていることを特徴とする請求項9記載のDNA検査方法。

【請求項11】励起光路から分離された蛍光検出光路内に蛍光のみを透過し励起光を遮光するフィルタを有することを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

【請求項12】上記M個のマルチ励起スポット光が上記対物レンズの壁上ではば同一位置Aを通過し、DNAチップで正反射した当該励起光が対物レンズの壁上の位置B'に達するように構成し、当該対物レンズの壁にあるB'の位置、もしくは蛍光検出光路内にあり上記対物レンズの壁と共に面上のB'の像位置、に反射励起光を遮光する手段を具備したことを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

【請求項13】上記M個のマルチ励起スポット光が上記対物レンズの壁上ではば同一位置Aを通過し、DNAチップで正反射した当該励起光が対物レンズの壁上の上記Aとは異なる位置Bを通過するように構成し、当該対物レンズの壁もしくは、蛍光検出光路内で対物レンズの壁と共に位置Bを中心とした所望の径の反射励起光を遮光する部材を配置することを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

【請求項14】上記反射励起光は正反射励起光であり、DNAチップ内の異物から散乱した励起光を上記遮光手段又は遮光部封外から取り出し、更に上記蛍光検出光路から分岐し、DNAチップの照射スポットと共役な位置で撮像し、当該撮像情報を用いて、上記マルチスポット励起光により発生した各マルチスポット光からの蛍光を分離して検出した情報を補正することを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

【請求項15】上記M個のマルチ励起スポット光は複数のレーザ光源により形成したことを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

【請求項16】上記複数のレーザ光源より出射した光を光ファイバに導入し、M個の所望のピッチで整列した当該光ファイバの出射端から出射することによりM個のマルチ励起スポット光を得ることを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

【請求項17】上記マルチスポット励起光により発生した各マルチスポット光からの蛍光を分離して検出する手段は超高感度のN_x × N_y画素数からなる2次元撮像装置であり、スポット径dの励起光をn_x、n_yを整数とし、x方向にn_x d、y方向にn_y dのピッチでN_x × N_yスポット同時に照射し、得られるN_x × N_y画素数からなる蛍光スポット像を該超高感度2次元撮像装置で検出し、DNA検出装置とDNAチップをピッチdで相対的にx y方向にn_x × n_yステップ移動することによりDNAチップの所望の領域を検出することを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

【請求項18】上記励起光は複数の異なる波長からな

(3)

特開2001-108684

4

り、複数の蛍光体を付加した異なるターゲットを分離して検出することを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

【請求項19】上記複数の波長からなる励起光を同時に照射し、複数の蛍光体を付加した異なるターゲットを分離して同時に検出することを特徴とする請求項18記載のDNA検査方法。

【請求項20】上記複数検査DNAチップの所望の蛍光体を付加したターゲットをハイブリダイゼーションした検査面上に、上記励起スポット光の近傍に第2の光を斜め入射させ、該検査面で反射した光の位置を検出することにより、焦点検出し、この情報を基づき検査面と上記対物レンズの相対距離を制御することにより焦点合わせを行ふことを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

【請求項21】励起光源からの励起光をDNAチップに照射する励起光照射系と、DNAチップ上の蛍光体から発生した蛍光を検出する蛍光検出系からなるDNA検査装置において、DNAチップ上に多数あるセルの寸法D以下のスポット径dを有する複数Mの励起光をDNAチップ上に同時に発生せしめるマルチスポット励起光発生光学系と、当該マルチスポット光をDNAチップ上のDNA断片に付加した蛍光物体に同時に上記寸法dで照射せしめる対物レンズと、得られる蛍光を当該対物レンズを介して蛍光検出光路に導くビームスプリッタと、上記マルチスポット励起光により発生した各マルチスポット光からの蛍光を分離して検出する蛍光検出手段と、DNAチップの所望の領域に亘りマルチスポット光を照射し蛍光検出するよう上記マルチスポット光の位置とDNAチップの位置を相対的に変化せしめ駆動手段と、当該駆動手段並びに蛍光検出手段により検出されたDNAチップの所望領域の蛍光強度と蛍光位置から被検査DNAチップのDNA情報を求め、検査する制御系からなることを特徴とするDNA検査装置。

【請求項22】上記マルチスポット励起光発生光学系は1次元もしくは2次元状に一定ピッチで直線上に配列している複数Mの励起光スポットを同時に発生することを特徴とする請求項21記載のDNA検査装置。

【請求項23】上記スポット径は上記セル寸法Dの整数Nに対しほぼ1/Nであることを特徴とする請求項21記載のDNA検査装置。

【請求項24】上記Nを2以上にしセルを複数の部分に分割し、1セル内にあるN²個のデータの内有意なデータのみを選択し、処理する上記制御系を有することを特徴とする請求項22又は23の何れかに記載のDNA検査装置。

【請求項25】上記DNAチップの全検査対象サンプル点数LN²に対し、LN²/(6×10³)秒以内の時間で蛍光検出することを特徴とする請求項24記載のDNA検査装置。

【請求項26】上記蛍光検出手段は上記DNAチップへ

の複数Mの照射スポットと共に面に形成されるスポット像の径とほぼ同程度の有効径を有するM個の受光開口有することを特徴とする請求項21記載のDNA検査装置。

【請求項27】上記照射スポット像とほぼ同程度の有効径を有するM個の受光開口は光ファイバ受光端であり、該ファイバの出射端より出射する光を分離して検出する蛍光検出手段であることを特徴とする請求項26記載のDNA検査装置。

10 【請求項28】上記DNAチップへの複数Mの照射スポットはスポット径d、整数kに対しほぼkdの間隔を待って直線上に配列し、当該スポットアレイを上記△t時間照射後、ほぼdだけアレイ方向に移動し、△t時間照射することを順次k回繰り返すことにより、アレイ方向にkM個のスポット位置に亘り検査を行い、かつDNAチップと上記対物レンズを少なくともアレイと直角方向に、相対的に移動することによりDNAチップの所望の2次元領域を検査する上記制御系を有することを特徴とする請求項21記載のDNA検査装置。

20 【請求項29】上記スポットアレイの移動は音響光偏向器を用いて行ふことを特徴とする請求項28記載のDNA検査装置。

【請求項30】上記整数kは2以上であることを特徴とする請求項28記載のDNA検査装置。

【請求項31】上記整数kは5以上であることを特徴とする請求項28記載のDNA検査装置。

【請求項32】上記スポットアレイはマイクロレンズアレイで形成することを特徴とする請求項21、28又は29の何れかに記載のDNA検査装置。

30 【請求項33】上記スポットアレイはホログラムで形成することを特徴とする請求項21、28又は29の何れかに記載のDNA検査装置。

【請求項34】上記スポットアレイのアレイ方向の移動と同期させ、励起光により生じた蛍光が上記受光開口上のはほぼ同一箇所に来るよう構成された偏向手段を具備した請求項21記載のDNA検査装置。

【請求項35】上記偏向手段は励起光を透過させ、蛍光を反射させる波長選択ビームスプリッタで構成されていることを特徴とする請求項34記載のDNA検査装置。

40 【請求項36】励起光路から分離された蛍光検出光路内に蛍光のみを透過し励起光を遮光するフィルタを有することを特徴とする請求項21記載のDNA検査装置。

【請求項37】上記M個のマルチ励起スポット光が上記対物レンズの壁上にほぼ同一位置Aを通過し、DNAチップで正反射した当該励起光が対物レンズの壁上の位置B'に達するように構成し、当該対物レンズの壁もしくは、上記蛍光検出光路内に該対物レンズの壁と共に面を蛍光検出手段と対物レンズの間に構成し、当該壁上にあるB'の位置もしくは壁共役面上のB'の像位置に反射励起光を遮光する手段を具備したことを特徴とする請求項26記載のDNA検査装置。

(4)

特開2001-108684

5

求項21記載のDNA検査装置。

【請求項38】上記M個のマルチ励起スポット光が上記対物レンズの瞳上でほぼ同一位置Aを通過し、DNAチップで正反射した当該励起光が対物レンズの瞳上の上記Aとは異なる位置Bを通過するように構成し、当該対物レンズの瞳もしくは、蛍光検出光路内で対物レンズの瞳と共に位置Bを中心にして所望の径の反射励起光を遮光する部材を配置することを特徴とする請求項21記載のDNA検査装置。

【請求項39】上記反射励起光は正反射励起光であり、DNAチップ内の異物から散乱した励起光を上記遮光手段又は遮光部材外から取り出し、更に上記蛍光検出光路から分岐し、DNAチップの照射スポットと共に位置で撮像する散乱像検出手段を具備し、当該散乱像検出手段で得られた撮像情報を用いて、上記蛍光検出手段で得られた情報を補正する制御系を有することを特徴とする請求項37又は38の何れかに記載のDNA検査装置。

【請求項40】上記M個のマルチ励起スポット光は複数のレーザ光源により形成したことを特徴とする請求項21記載のDNA検査装置。

【請求項41】上記複数のレーザ光源は複数の半導体レーザ光源により形成したことを特徴とする請求項33記載のDNA検査装置。

【請求項42】上記複数のレーザ光源より出射した光を光ファイバに導入し、M個の所望のピッチで整列した当該光ファイバの出射端から出射することによりM個のマルチ励起スポット光を得る手段を具備したことを特徴とする請求項40又は41の何れかに記載のDNA検査装置。

【請求項43】上記蛍光検出手段は超高感度のN_x × N_y画素数からなる2次元撮像装置であり、スポット径dの励起光をn_x × n_yを整数とし、x方向にn_x、d、y方向にn_y、dのピッチでN_x × N_y、スポット同時に照射し、得られるN_x × N_y画素数からなる蛍光スポット像を該超高感度2次元撮像装置で検出し、DNA検査装置とDNAチップをピッチdで相対的にx y方向にn_x × n_y、ステップ移動することによりDNAチップの所望の領域を検出する上記制御系を有することを特徴とする請求項21記載のDNA検査装置。

【請求項44】上記励起光源は複数の異なる波長光源からなり、複数の蛍光体を付加した異なるターゲットを分離して検出することを特徴とする請求項21記載のDNA検査装置。

【請求項45】上記被検査DNAチップの所望の蛍光体を付加したターゲットをハイブリダイゼーションした検査面上に、上記励起スポット光の近傍に第2の光を斜め入射させ、該検査面で反射した光の位置を検出することにより、焦点検出し、この情報を基づき検査面と上記対物レンズの相対距離を制御することにより焦点合わせを行なう焦点検出系を具備したことを特徴とする請求項21

記載のDNA検査装置。

【請求項46】上記第2の斜め入射させる光は上記蛍光体を励起しない波長を用いることを特徴とする請求項45記載のDNA検査装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はDNAを蛍光検出により検査する装置に関する。特に多数の生体のDNAを高速に検査するDNA検査方法及びその装置に関する。

【0002】

【従来の技術】従来のDNAチップの検査では、DNAチップ上に励起光のスポットを1点照射し、この照射した励起光により発生する蛍光を共焦点検出することを、DNAチップと検出スポットとの相対位置を変化させてチップ上の照射位置を順次変化させることにより、チップ上の所望の場所を順次検出する方法により行っていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】DNAの検査を、従来の血液検査のような生体検査に適用しようとすると、多数の生検体に対し、高速に行なうことが不可欠になる。しかるに、従来の技術では、DNAチップの必要な検査分解能に対し、この分解能相当の励起光スポットを1点照射し、得られる蛍光を順次検出していると、検査時間が大幅にかかる。これは、この1点の検出当たりに必要な時間が無制限に短くできないことに関係している。即ち、励起光を照射したのち、蛍光が発生し終わるまでの時間△t₁がおよそ100秒程度かかるためである。蛍光が終わるのを待たず次に検出点に移ってしまうと検出できなくなる。

【0004】また、上記の必要な検出分解能相当のスポット光サイズ中に、数個の蛍光分子があるような状態まで高感度に検出することが必要である。しかし、発生した蛍光が絶て検出されるわけではない。即ち、検出光学系の光利用効率や光検出に用いられる光電子倍増管等の効率が、100%ではない。更に、励起光が蛍光物体で吸収される効率や、吸収された励起光が蛍光に変わる確率が小さい。このため、△t₁の少なくとも数十倍から数百倍の時間をかけて検出する必要があり、更にこの時間は長くするほど、フォトンカウントに近い微弱光に対する検出精度が高くなる。

【0005】また、このような高速性を実用レベルで達成するには、DNAチップに混入する各種タンパク質からなる異物の影響を除去或いは低減したり、蛍光体を付加したターゲットをハイブリダイゼーションした検査面上に、検出系の焦点を常時合わせる必要がある。また、複数の蛍光に対して、高速に検査することが必要になる場合もある。

【0006】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するた

(5)

特開2001-108684

7

めに、本発明では以下に示す様な手段を施している。

【0007】各セルの寸法D以下のスポット径dからなり複数Mの励起光を互いに異なる位置に蛍光検査時間以上の時間△tに亘り対物レンズを用いて同時に照射し、得られる蛍光を蛍光検出光路に導き、DNAチップの照射スポットと共に異なる関係にある結像面で検出し、蛍光の位置と強度から被検査DNAチップの検査を行う。このとき上記スポット径は上記セル寸法の整数Nに対しほぼ1/Nにする。更に上記照射スポット位置とDNAチップの相対位置を順次j回に亘り異ならしめ全検査対象位置 $LN^2 = M$ を検査する。またNを2以上にしセルを複数の部分に分割し、1セル内にある N^2 個のデータの内有意なデータのみを選択し、処理することにより正確な検査を行う。このようにすることにより、DNAチップの全検査対象サンプル点数 LN^2 に対し、 $LN^2 / (6 \times 10^6)$ 秒以内の時間で蛍光検出する。

【0008】上記DNAチップへの複数MのDNAチップへの照射スポットと共に異なる関係にある結像面で照射スポット像とほぼ同程度の有効径を有するM個の受光開口を有し、当該受光開口外は遮光し、当該受光開口を透過した各々の光を検出することにより、照射スポットあるいは照射スポット面以外からの雜音光を除去し信号対雜音比の高い検査を行っている。また上記照射スポット像とほぼ同程度の有効径を有するM個の受光開口は光ファイバ受光端であり、該ファイバの出射端より出射する光を検出することにより更に信号対雜音比の大きな検出を行っている。

【0009】上記DNAチップへの複数Mの照射スポットはスポット径d、整数kに対しほぼk dの間隔を持って直線上に配列し、このスポットアレイを上記△t時間照射後、ほぼdだけアレイ方向に移動し、△t時間照射する。この動作を順次k回繰り返すことにより、アレイ方向にkM個のスポット位置に亘り検査を行い、かつDNAチップと検査装置を少なくともアレイと直角方向に、相対的に移動することによりDNAチップの所望の2次元領域を検査する。また上記スポットアレイの移動は音響光偏向器を用いて行うことを特徴とする。また整数kは2以上であることが望ましく、さらにkは5以上であると信号対音比の上で更に有利である。

【0010】上記スポットアレイはマイクロレンズアレイで形成する。また上記スポットアレイはホログラムで形成することもできる。上記スポットアレイのアレイ方向の移動と同期させ、励起光により生じた蛍光が上記受光開口上のはば同一箇所に来るよう蛍光検出光路内に蛍光検出偏向手段を設ける。この際上記蛍光検出偏向手段は圧電素子を用いた偏向手段を用いる。また上記蛍光検出偏向手段は励起光を透過させ、蛍光を反射させる波長選択ビームスプリッタで構成することにより効率よく検出できる。また励起光との分離を良くするため励起光路から分離された蛍光検出光路内に蛍光のみを透過

8

し、励起光を遮光するフィルタを用いる。

【0011】上記M個のマルチ励起スポット光が上記対物レンズの瞳上ではば同一位置Aを通過するようにし、DNAチップで正反射した当該励起光が対物レンズの瞳上の位置B'に達するように構成する。このようにして、対物レンズの瞳上にあるB'の位置、もしくは蛍光検出光路内にあり上記対物レンズの瞳と共に役な面上のB'の像位置、に反射励起光を遮光する手段を施すことにより雜音成分となる励起光を蛍光検出信号から除去する。

【0012】また上記M個のマルチ励起スポット光が上記対物レンズの瞳上ではば同一位置Aを通過し、DNAチップで正反射した当該励起光が対物レンズの瞳上の上記Aとは異なる位置Bを通過するように構成する。このようにして対物レンズの瞳もしくは、蛍光検出光路内で対物レンズの瞳と共に役な位置にBを中心に所望の径の反射励起光を遮光する部材を配置する。このようにして雜音成分となる励起光を蛍光検出信号から除去する。

【0013】更に上記遮光する反射励起光を正反射励起光にし、DNAチップ内の異物から散乱した励起光が上記遮光手段又は遮光部材外から透過するようにして取り出し、取り出された散乱光を上記蛍光検出光路から分岐し、DNAチップの照射スポットと共に位置で撮像して、検出する。検出した散乱光の像の撮像情報を用いて、上記蛍光検出手段で検出した蛍光情報を補正する。このようにすることによりDNAチップ内に存在する異物からの散乱光の影響を排除して正確な検出が可能になる。

【0014】上記M個のマルチ励起スポット光をレーザ光源で形成する。このようにすることにより微小なスポットに強度の大きい励起照射が実現する。またM個のマルチ励起スポット光を複数の半導体レーザ光源により形成することにより、小さな実装体積でより大きな励起照射が実現する。この際上記複数の半導体レーザ光源より出射した光を光ファイバに導入し、M個の所望のピッチで整列した当該光ファイバの出射端から出射する構成にする。このようにすることにより所望のピッチ配列であるM個のマルチ励起スポット光を得ることが可能になる。

【0015】光信号普適型撮像手段として超高感度の $N_x \times N_y$ 画素数からなる2次元撮像装置を用い、 n_x 、 n_y を整数とし、スポット径dの励起光を x 方向に $n_x \times d$ 、 y 方向に n_y 、 d のピッチで $N_x \times N_y$ 、スポット同時に照射する。このようにして得られる $N_x \times N_y$ からなる蛍光スポット像を超高感度2次元撮像装置で検出し、かつ検出装置とDNAチップとの相対位置をピッチdで x 、 y 方向に $n_x \times n_y$ 、ステップ移動する。このようにすることによりDNAチップの所望の領域を検出することが可能になる。

【0016】また上記励起光は複数の異なる波長からな

(6)

特開2001-108684

9

り、複数の蛍光体を付加した異なるターゲットを分離して検出する。更に上記複数の波長からなる励起光を同時に照射し、複数の蛍光体を付加した異なるターゲットを分離して同時に検出する。このようにすることにより多様な検出対象を高速に行うことが可能になる。

【0017】上記被検査DNAチップの所望の蛍光体を付加したターゲットをハイブリダイゼーションした検査面上に、上記励起スポット光の近傍に第2の光を斜め入射させ、該検査面で反射した光の位置を検出することにより焦点検出する。この検出情報に基づき検査面と上記対物レンズの相対距離を制御することにより焦点合わせを行うことが可能になる。また、上記第2の斜め入射させる光が対物レンズを通過するように構成することにより、簡単な構成で焦点検出、制御が可能になる。

【0018】上記第2の斜め入射させる光を検出面にたいしS偏光にする。このようにすることにより、蛍光検出面での反射率を高め、正しい焦点検出が可能になる。更に上記第2の斜め入射させる光は上記蛍光体を励起しない波長を用いる。このようにすることにより、蛍光検出信号に雜音を重畳させずに正確な検出が可能になる。

【0019】

【発明の実施の形態】図1は、本発明の実施形態を示す図である。1は蛍光検出のために、マルチスポット励起光形成し、DNAチップ2に照射するマルチスポット励起光照射系であり、3はマルチスポット励起光で発生した蛍光を検出する蛍光検出系である。11は励起光光源と励起光のビーム成形光学系を含む励起光光源である。He-Neレーザ光を焦点距離の異なる2個のシリンドリカルレンズで所望の縦横ビーム径比に成形し、ミラー100を経由しAO偏向器に入射させる。AO偏向器には水晶振動子に印加する周波数 ω の高周波電圧端子とこの周波数より低い振幅信号 ω_0 の入力端子がある。

【0020】制御回路4から送られる周波数 ω の信号は $\omega \pm \omega_0$ の範囲の周波数帯を持っている。周波数が変わるとAO偏向器に入射する励起光の回折角が変わる。また制御回路4から振幅信号 ω_0 を入力すると回折効率が変わるので、回折光の強度を制御することができる。AO偏向器を通った回折光は1次光(図示せず)と分離され(1次光は遮光される)、焦点距離 f_1 と f_2 の2つのレンズ131と132からなるレンズ系13により所望のビーム系でマイクロレンズアレー14を照射する。AO偏向器の周波数を変化させると、マイクロレンズアレー14に入射する励起光の位置は変わらずに角度が変化する。

【0021】図4はマイクロレンズアレー14の拡大詳細図である。ガラスでできた微小マイクロレンズが1次元状に32~256個、多数並んでおり、ここに入射した光は、例えば実線で示す1010はマイクロレンズを透過し、各マイクロレンズ141, 142……を透過し、焦点面Σ上の直線Lの上に微小スポット111, 1

10

12……11Mを結ぶ。AO偏向器の周波数を変えると図4の点線で示すようにマイクロレンズに入射する励起光の角度が変化し、直線L上の微小スポットの位置が1j, 1, 1j, 2……1j, Mの様に変化する。

【0022】マイクロレンズアレー14の焦点面Σ上にできた微小スポットアレー111, 112……11Mは図1に示すようにレンズ15と対物レンズ16によりDNAチップ2のハイブリダイゼーションされたターゲットに付加した蛍光体を照射し、励起する。このターゲットが付いているガラス面Σ1又はΣ2(詳しくは図3-3参照)上で最小のビーム径となるよう対物レンズ16のフォーカスがなされる。

【0023】図2はDNAチップ2の面構造の詳細を示したものである。縦横の細い線で示した正方形の最小単位201, 211, 202, 212等は検出経路を表す。図では5×5の経路(太い線で示す)分がセル20である。1つのセルには同一のDNA情報の断片が植えられている。従ってこのセルには同じDNA断片構造を持つターゲットがハイブリダイズされる。

【0024】このように1つのセルを複数の経路で分割する理由は1つのセル内に異物であるタンパク質等が混入していたとき、このタンパク質に入射した励起光により、大きな強度の蛍光が発生するようになる。通常このような異物の寸法はせいぜい数μmであるので、経路寸法が数μmであり、セルの寸法が例えば10μmならば、10μmのセル内の異物位置が後述するような方法で検出、分離できれば、異物部分以外の情報により蛍光の大きさを正確に求めることができる。

【0025】図3はDNAチップの側面図である。この経路ではハイブリダイズされているターゲットがガラス基板の上に線で乗っている構造になっている。このような場合もあるし、後述するようにガラス基板の間に挟まれている場合もある。いずれにしてもターゲットのある面に微小励起光スポットが集光される。この集光径は図2で示した正方形最小単位である検出の経路の寸法にほぼ等しい。

【0026】AO偏向器の初期の直波数では図1の実線で示す回折光が得られており、このときには図3に示すようにDNAチップに101, 102, 103……の様に励起光スポットアレイがDNAチップ上の経路201, 202, 203……20Mに照射され、後述するように各経路の蛍光が検出される。この励起光の照射時間は蛍光減衰時間以上の時間△t(数~数百μs)で、本実施形態例では60μsである。

【0027】60μs経過後、AO偏向器の周波数が変えられると励起光の回折角が変わり、図1および図4で示すように、マイクロレンズアレーには点線で示す10j, 0の光が入射し、図3のDNAチップには111, 112, 113……11Mの様に励起光スポットアレイが照射され、211, 212, 213……21Mの経路

(7)

特開2001-108684

11

の蛍光が検出される。このようにしてM個のマルチスポットが絵素ピッチずつずれて順次照射され、j絵素分ずれるとjM絵素分が總て検出されることになる。

【0028】次に蛍光検出の実施形態を図1で説明する。レンズ15と対物レンズ16の間にあるビームスプリッタ30は波長分離ビームスプリッタである。本実施形態で用いている励起光源HE-Neレーザの波長は633nmであり、チップ上のターゲットに付加されている蛍光体はCyt5である。検出する蛍光の波長は670nm近辺である。

【0029】波長分離ビームスプリッタ30は633nmでは45度入射光をほぼ100%透過し、670nmの蛍光は45度入射ではほぼ100%反射である。しかし633nmもごくわずか反射する。このごくわずかの反射でも、蛍光が非常に微弱であるので問題となる。そこで図1の実施形態では670nmに中心波長特性を持ち、反応幅が約15nmの干渉フィルタ34を蛍光検出系3に挿入し、励起光の漏れをこの干渉フィルタで遮光している。なお34は干渉フィルタに限定されるものではなく、ある波長以上は透過し、以下は遮光するいわゆる色フィルタを用いても良い。また色フィルタと干渉フィルタを組み合わせて用いても良い。以降の実施形態の説明では説明の簡潔のため干渉フィルタのみで説明する。

【0030】次にAO偏向器を用いてマルチスポット励起光のDNAチップ上の位置を変化させると、検出蛍光像の位置の変化と、固定の検出器で検出するために行う必要のある、前記位置変化の補正について説明する。図1の波長分離ビームスプリッタ30はこの位置変化の補正も行っている。図5は図1の主要な部分を示しており図1と同一番号は同一物を表している。波長分離ビームスプリッタ30は5~10kHzの高い共振周波数特性を持つピエゾ素子301で駆動され、y軸を中心に微小回転する構造になっている。

【0031】図6、図5はこの微小回転の復割を示した図であり、図1と同一番号は同一物を表している。制御回路4からAO偏向器12に入力される偏向信号により、図6(C)のDNAチップ2上のマルチ励起微小スポット1011、1021、……、10M1のそれぞれの位置が絵素ずつ1012、1022、……、10M2と順次変化させていく。このとき図6(D)に示すように波長分離ビームスプリッタ30が回転しないとすると、DNAチップと共に位置にある蛍光検出面Σp上上のマルチ蛍光点1211、1221、……、12M1はやはり絵素ずつ1212、1222、……、12M2へ変化する。

【0032】蛍光検出面上の蛍光スポット像1212は、図に示すように、蛍光検出用マイクロレンズアレー321により1212点が光ファイバ束322の1本のファイバ端に結像し、ファイバに入射する。1本の光フ

12

ァイバは光が通る芯3221とそれを保護する部分3222から成り立っている。光が通る芯の径は、蛍光検出面Σp上上の(マルチ)蛍光点1211よりやや大きい。しかし、波長分離ビームスプリッタ30が回転しないと、1211点がAO偏向器の駆動により1212、1213、1214、……と移動し、ファイバ入射端からずれていき、検出できなくなってしまう。そこで高い共振周波数特性を持つピエゾ素子301で図7に示すように波長分離ビームスプリッタ30を微小回転駆動する。

【0033】すなわち微小回転しない場合の図6では、蛍光微小スポット像1211が異なる場所1212、1213、1214に移動したのに対し、微小回転することにより、図7の点線の枠内に示すようにΣp上のはば同一位置にスポットがくる。

【0034】図8は、以上説明したAO偏向器12のON-OFFあるいは強度変調信号S_{A12}、同じくAO偏向器の偏向信号S_{B12}、波長分離ビームスプリッタ30を偏向駆動するピエゾ素子301の駆動信号

20 S₃₀₁、ファイバ32を介してk番目の1つのフォトマル33で検出する蛍光検出信号S₃₀₁、この蛍光検出信号の絵素ごとの画像蓄積(積分)信号S'₃₀₁、およびこの画像蓄積の各絵素毎の最終結果(画像蓄積)している。励起スポット光が次の絵素の励起に移る前の時刻でS'₃₀₁をサンプルホールドした値)S''₃₀₁について各信号の相対的な時間変化を表している。このグラフの実施例ではマルチスポット励起光をAO偏向器により順次1絵素ずつずらして行き、このようにして1つのスポットを10絵素まで順次ずらしている。

30 【0035】このずらす数は、各絵素の検出のSNを向上させるため2以上必要であり、大きいほどSN向上を図る上で望ましいが、装置の構成部品上の制限等により自ずと上限がある。しかし5以上にすると隣接するスポット励起光による光路途中の異物照射に伴う散乱光、あるいは蛍光の影響等が大幅に少なくなる。

【0036】図8に示すようにAO偏向器12の周波数(超音波水晶振動子に与える超音波の周波数、すなわち偏向器の偏向角速度)信号S_{B12}を順次ステップ的に変え、この間この変化に応じて波長分離ビームスプリッタ30を偏向駆動するピエゾ素子301の駆動信号

S₃₀₁を線形に変化させる。AO偏向器12が超音波の伝播による透明媒体の屈折率のごくわずかな変化により、光を回折させているのに対し、ピエゾ素子301はビームスプリッタ全体を駆動させるため、周波数応答性が異なるため早いAO偏向器の信号S_{B12}はステップ、遅いピエゾ素子の駆動信号S₃₀₁は線形にしている。

【0037】図9はこの2つの信号により蛍光検出面Σp上できる蛍光スポット像の位置を示した図である。この図の上から下への変化は時間tの経過を表してい

(8)

特開2001-108684

13

る。左の2つのグラフは $S_{\theta:1:1}$ と $S_{\theta:0}$ の変化であり、図8ではステップ数が10であったが、この図ではステップ数が5である。図9のグラフの右側にある実線の丸 O $3211'$ 、 $3221'$ 、 $3231'$ ……は蛍光検出マルチスポット像が図6で説明したようにビエゾ素子による位置補正をおこなわない場合の像の位置ずれを示している。なお、図の右方向（横方向）はスポットアレイの配列方向 x 、を表しており実線の丸 O 、 $3212'$ 、 $3222'$ 、 $3232'$ ……は隣接する蛍光スポット像の位置ずれを示している。点線の丸 O はビエゾ素子により位置補正を行った結果である。

【0038】すなわち、AO偏向器でステップ移動し、励起光が停止していても、ビエゾ素子は楕形に偏向を駆動しているため励起光が停止している間に蛍光検出面 Σ 上できる蛍光スポット像の位置は $3211'$ 、 3211 、 3211 、とわずかではあるが動いてしまう（隣の蛍光スポット像の位置では 3212 、 3212 、 3212 、とわずかではあるが動いてしまう）。

【0039】励起光がDNAチップ上の次の照射位置にステップ移動し停止している間には、蛍光スポット像の位置は、 3221 、 3221 、 3221 、とわずかではあるが動いてしまう（隣の蛍光スポット像の位置では 3222 、 3222 、 3222 、とわずかではあるが動いてしまう）。この蛍光スポット像のわずかな動きをカバーして検出するには図9の下の図10に示すように蛍光検出光面（あるいは受光面と共役な面） 320 にアレイ方向 x 、に長い長円開口の配列 3201 、 3202 …… $320M$ を設ける。上記のファイバでの検出の場合にはファイバの入射端面がこの長円を含めば良い。

【0040】図11は、本発明の実施形態を示す図である。図1と同一番号は同一物もしくは同一機能を有するものを表す。本図では図1の全体装置のうちマルチスポット励起光発生に関わる部分のみを示している。それ以外の構成は基本的には図1と同じである。 $14'$ はマルチスポット発生ホログラムである。

【0041】図12は、このマルチスポット発生ホログラムの作成方法を示す図である。図12に示すように、マルチスポット励起光の寸法に対応したホール径を有するピンホールアレイ $1j:1'$ 、 $1j:2'$ …… $1j:M'$ 開口を有するマスク180レーザ子を照射し、透過光をフーリエ変換レンズ15でホログラム記録媒体上に集光する。この集光位置に参考光1000を入射角 ϕ = ϕ で若干斜めから直ねて照射し、上記の集光位置にフーリエ変換ホログラムを作る。

【0042】光の利用効率を向上するため、位相調製型の記録媒体を用いる。またフーリエ変換面上の中心位置でのり次光（空間回波数がりの位置）の強度が桁違いに大きくなりなり、できたホログラムのSN、回折効率等が悪くなるのを防ぐため各開口には互いの位置に無関係なランダムな位相を付加しておく。

14

【0043】このようにして作られたホログラムを図1のDNA検査装置のマルチスポット励起光発生系に用いる。

【0044】図11のAO偏向器12に入射したレーザ光は、レンズ系13を通った後、上記の方法で作られたホログラム $14'$ を入射角 ϕ 。照射する。AO偏向器の駆動周波数の中心（偏向角度の中心）ではホログラムに入射するレーザ光の入射角 ϕ は ϕ 。となり、図12の方法でホログラムを作成する時の参考光1000のホログラム面に対する入射角度 ϕ 。に等しくなるようにしておく、このようにしてホログラムにレーザ光を照射すると、図11に示すように $1j:1$ 、 $1j:2$ …… $1j:M$ に図12のホログラム作成時のピンホールアレイと同一のスポットアレイを再生する。

【0045】次にAO偏向器の回波数を変化させると、ホログラムへの入射角度がわずかに変わるので、マルチスポット再生光の角度もわずかに変わる。この結果、隣の絵素に相当する位置を励起照明することになる。AO偏向器を順次駆動していけばステップ的にDNAチップを1絵素ピッチで順次位置を変えてマルチスポット励起照明ができる。

【0046】図13は、本発明のDNA検査装置の実施形態を示す図である。図1と同一番号は同一物を表している。本実施形態では、図1の実施形態と異なり、同時に2次元的な検出を行っている。すなわち、励起照明光は2次元的に広い範囲を同時に照明可能な照明系レンズ13'を通し、波長選択ビームスプリッタ30'で反射し、2次元マルチレンズアレイ $14'$ を照明する。 $14'$ の2次元マイクロレンズアレイは、すでに図1～4を用いて1次元のマイクロレンズアレイを説明したと同じ機能を有し、2次元的なアレイ配列のみが異なっている。従って図14に示すようにマイクロレンズ 141 の焦点位置に2次元微小スポット $1410'$ を形成する。

【0047】本実施形態の場合には、この $1410'$ の位置を中心にピンホール開口が明けられている。このようにピンホール開口のみを通過する光がDNAチップを照射する。微小マルチスポット光のスポット $1410'$ の径 d とスポットの配列ピッチ p の比は2以上の整数で、5以上が望ましい。図13に示すようにピンホール開口を通過した2次元マルチスポット光は高解像レンズ $16'$ によりDNAチップを同時に励起照射する。励起照射される絵素 $2 \times 11y11$ 、 $2 \times 12y11$ 、 $2 \times 11y21$ 、 $2 \times 21y21$ 、……は4絵素とばして等ピッチ間隔である。

【0048】同時に励起照射された上記絵素から発生する蛍光は上記高解像レンズ $16'$ を通り、マイクロレンズアレイ下面の各ピンホール $1410'$ を通過する。ピンホールを通過した光はマイクロレンズを通過することにより、各マイクロレンズ上面（凸面）の大きさに広が

(9)

特開2001-108684

15

る。このマイクロレンズ上面の蛍光強度が波長選択ビームスプリッタ30' と結像レンズ31' を介して画像蓄積型高感度2次元センサ32' に結像される。本図では干渉フィルタが描かれていないが、波長分離ビームスプリッタ30' と2次元センサ32' の間に干渉フィルタ、または蛍光より長い波長を透過する色フィルタを設置する。

【0049】図4及び図14に示した1次元及び2次元のマイクロレンズアレイでは、各マイクロレンズの隣接するマイクロレンズの中間の領域に入射する光は散乱光になりノイズとなる危険性がある。そこでこの中間の領域を酸化クロム等の材質からなる遮光部で覆うマスキングを行えば(図示せず)このようなノイズを除去することができる。

【0050】以上の実施形態、図1、5、7、及び13に用いている波長分離ビームスプリッタ30、30' と干渉フィルタ34の分光反射特性と分光透過特性をそれぞれ図15及び図16に示す。両方を用いることにより励起光の影響を少なくでき、正確な検出ができるようになる。図で λ_0 は励起光の波長であり、通常スポット照射の単位面積当たりの強度を大きくするためレーザ光を用いるため励起波長バンド幅は狭い。 λ_L は検出しようとする蛍光の中心波長である。

【0051】ハイブリダイゼーションしようとするDNA断片に付加される蛍光体には、何種類かの蛍光物質が用いられる。例えば、良く用いられるCy5 (Cyanine 5) では、蛍光体の吸収のピーク波長は649nm、蛍光のピーク波長は670nmである。また、更に短波長側では、Cy3 (Cyanine 3) では蛍光体の吸収のピーク波長は550nm、蛍光のピーク波長は570nmである。吸収体の分光吸収特性はバンド幅を有するため、吸収のピーク波長と励起レーザ光の波長は必ずしも一致させる必要はなく、吸収ピーク波長に近い、レーザ光が用いられる。

【0052】Cy5ではHe-Neレーザの赤の光633nmや波長635nmの半導体レーザ光を、Cy3ではHe-Neレーザの緑の光544nm等を用いる。蛍光のみを取り出す干渉フィルタ、及び波長分離ビームスプリッタは、蛍光のピーク波長に近く、励起光を分離しやすい波長を中心波長に選ぶ。

【0053】上述した蛍光検出に際し、励起光を完全に遮光することが特に蛍光が微弱な場合に非常に重要となる。

【0054】図17は、このような励起光の遮光をより完全に行うための本発明の実施形態図である。即ち、上述の干渉フィルタや波長選択ビームスプリッタのみでは不十分な場合、或いは、蛍光検出光強度を大きくするため、干渉フィルタのバンド半幅幅を大きくしようとする場合に実施する。図17で図1と同一番号は同一物もしくは同一機能を有するものである。

16

【0055】マイクロレンズアレイやホログラムでΣ、面上に形成されたマルチスポットアレイ111、……、11Mは、レンズ15及び対物レンズ16によりDNAチップ上に励起光として結像される。この際各マルチスポット光が対物レンズの入射瞳EP₀の中心にほぼ半径RNA_c'の広がりで通過する。対物レンズの開口数をNA、焦点距離をfとするとき励起光のDNAチップ上のスポット径Dsは次式で与えられる。

【0056】 $D_s = 2k_1 f \lambda / RNA_c'$

(但し $k_1 = 0.6$)

DNAチップ検出の絶縁分解能(絶縁ピッチ)をpとすると、この値はほぼDsに等しい。pを2μm、励起光波長λを633nmとすると、RNA_c'/fは0.19となる。RNA_c'/fは2μmのスポットを照射するための照度のNA(2μmスポットを結像するため必要な対物レンズの最低限のNA)でこれをNA'とする。

$NA' = \sin(\tan^{-1}(RNA_c' / f)) = RNA_c' / f = 0.19$

となる。対物レンズ16のNAは微弱な蛍光を検出するため0.7以上0.9以下である。対物レンズの入射瞳を上記のスポット径で通過した各励起スポット光は、対物レンズによりDNAチップ上に約2μmの励起スポット光を照射する。この対物レンズは両テレセントリックであるため、DNAチップに垂直に入射した励起光はチップ表面で約4~8%の励起光が正反射し、対物レンズに向ってくる。この正反射光は波長分離ビームスプリッタにより、励起光は透過されるが、わずかに反射し蛍光検出系3に向かう。

【0057】蛍光検出系には干渉フィルタ34があり、励起光は遮光されるが、完全な遮光が難しい。即ち、干渉フィルタのバンド幅を広くして蛍光ができるだけ多く検出しようとすると、励起光がわずかに漏れる。そこで蛍光スポット光を蛍光検出面(或いはそれと共に面)に結像検出するレンズ系31'を図のようにレンズ系311と312で構成し、対物レンズの瞳が311と312の間の位置に結像するようにする。この瞳と共に位置に空間フィルタ35を配置する。空間フィルタ35は図18に示すような構造を持っている。

【0058】レンズ径311による対物レンズ壁面の空間フィルタ35への結像倍率を1倍とする。空間フィルタは、遮光部353の光軸中心から対物レンズの瞳半径と等しいRNAの半径を有する開口の中心部に、半径RNAの円形の遮光部351を有する。DNAチップで正反射したマルチスポット励起光はこの空間フィルタ上でビーム径RNA_c'になっている。従ってRNA_c'/RNA_cであれば正反射光はこの遮光部351で遮光される。

【0059】一方マルチスポット励起光で励起され発生する蛍光は、ほぼ無指向で対物レンズに入射し、この空

(10)

特開2001-108684

17

間フィルタに入射してくる。遮光部351により、蛍光も遮光されるが、遮光される蛍光の空間フィルタ入射蛍光に対する比率は $(NA' / NA)^2$ となり、上記値を入れると7 ($NA = 0.7$ の時) ~4 ($NA = 0.9$ の時) %になり、このロスは無視できる程度である。

【0060】このように、検出すべき蛍光の光量を落とさずに不必要的励起光を大幅に低減することができ、空間フィルタを透過した蛍光検出光は、レンズ34と干涉フィルタ34を通り、検出面であるファイバの入射端にDNAチップのスポット像を結像し、蛍光検出される。

【0061】図19は、本発明の実施形態を表す図である。励起光を蛍光検出光路に導かないようにする方法を示す。図1と同一番号は同一物を表す。励起光路と蛍光検出光路を分歧するビームスプリッタは本実施形態では偏光ビームスプリッタ30°を用いている。即ち励起光をこの偏光ビームスプリッタのスプリット面にたいしP偏光で照射する。DNAチップ表面で反射し戻ってくる励起光はP偏光を保っているので、偏光ビームスプリッタを通過し、蛍光検出光路には入らない。他方発生する蛍光の偏光は励起光とはずれているので偏光ビームスプリッタ30°でS偏光は反射し蛍光検出光路に導かれる。このようにすれば励起光の蛍光検出光路への入射を防ぐことができる。

【0062】図20は、本発明の実施形態を示す図であり、蛍光検出を光ファイバとマルチチャンネル光電子倍増管を用いて行うものである。図1、5、7、17、及び19に示した実施形態における蛍光マルチスポット像の検出具体内容を示している。マルチスポット数がM以上の数からなるファイバ系32の入射端は図21に示すようにM個の1次元配列したマルチレンズアレイ321である。

【0063】図7で説明したように、蛍光マルチスポット像は、各マイクロレンズによりファイバの光を伝搬する芯(コア)に入射される。マルチチャンネル光電子倍増管33が図20に示すように2次元の受光開口配列の場合には、ファイバの出射端が2次元配列になるようになる。各出射端から出てきた蛍光は、図20の実施形態の場合には結像レンズ324により、ファイバ出射端323が光電子倍増管33の各受光開口331に対応して結像するようになる。

【0064】図21の実施形態の場合には、ファイバの出射端に2次元レンズアレイ3241が対応して設置されており、各ファイバから出射した蛍光は各レンズを通り、直接マルチチャンネル光電子倍増管の2次元受光開口(光電子面)3311に集光するようにしている。図20、21に示した実施形態では、2次元のマルチチャンネル光電子倍増管であったが、1次元のマルチチャンネル光電子倍増管でも、出射端を1次元配列にすることにより、同じ方法で実現できる。

18

【0065】図22は、本発明の実施形態を示す図である。本実施形態では、励起光として複数の波長を用いている。光源系11A、11B、及び11Cは、異なる波長 λ_A 、 λ_B 、及び λ_C の励起光源からの光を成形し、ファイバ束に入射させ、出射端にマルチレンズアレイを配列し、出射後のほぼ集光する位置にピンホールアレイを設けている。ピンホールアレイを出射した励起光は、波長分離ビームスプリッタ30A、30B、30Cを通るよう構成されている。図22に示されているように、11Aが蛍光検出の励起光に選ばれている時には、 λ_A の励起光がレンズ15を通過して、偏向ミラー300で反射され、対物レンズ16を通り、DNAチップ2をマルチスポット励起照射する。各スポットから発生する蛍光は、対物レンズ16、偏向ミラー300、レンズ15(31)を通り、波長選択ビームスプリッタ30Aで反射し、干涉フィルタ34Aを通り、図20及び21で説明したような方法で各スポットの蛍光をマルチチャンネル光電子倍増管検出する。

【0066】検出する蛍光が異なるタイプの場合には、20制御装置4'から国示していない駆動機構により実線矢印の方向に光源系全体を移動し、異なる波長 λ_B 及び λ_C のいずれかを選択し、この波長で蛍光検出を行う。1つのDNAチップに複数の蛍光を用いている場合には、光源系を順次移動させて、次々に異なる励起光で検出していく。

【0067】図26は、上記の複数の蛍光を用いる場合の異なる実施形態である。図22と異なり、複数の励起光を同時に照射し、検査時間の短縮を図ったものである。図26では複数の波長 λ_A 、 λ_B 、 λ_B' 及び λ_C が例えば赤、緑、青の3色の光源系11A'、11B'、及び11C'から出射した光は波長選択合成功ミラー51、52により、1つの光路に効率よく合成される。即ち波長選択合成功ミラー51は青を透過し、緑を反射する。また波長選択合成功ミラー52は赤を透過し、緑と青を反射する。

【0068】合成された3色は、ビームスプリッタ30'を通過し、レンズ15、偏向ミラー300、対物レンズ16を通過し、DNAチップ上に3色同時にスポット励起照明する。各波長でそれぞれの蛍光体が励起され、それぞれの蛍光色で発光するが、概ね、励起光よりわずかに長い波長の蛍光であるので、これら3波長の光で励起された3波長の蛍光を、波長分離ビームスプリッタ53、54で波長分離することができる。即ち波長分離ビームスプリッタ53は青の蛍光を反射し、緑と赤を透過し、波長分離ビームスプリッタ54は緑を反射し、赤を透過する。

【0069】このように各3色に分離された光路に、それぞれの蛍光のみを純度高く透過させる干涉フィルタ34C、34B、及び34Aを配置し、各蛍光の微小スポット像を上述の方法によりファイバを介して、マルチ

(11)

特開2001-108684

19

ヤンネル光電子倍増管33C'、33B'、及び33A'で同時に検出する。

【0070】図22及び図26の実施形態では、励起マルチスポット光のアレイ方向の走査を偏光ミラー300で行う。偏光ミラーはピエゾ駆動方式もしくはガルバノミラータイプのものを用いる。この場合、図1で説明した実施形態とは異なり、マルチスポットはステップ移動ではなく、連続(樹形)走査になる。DNAチップ上でマルチスポットは走査になるが、検出光路にも同じ(同一の)偏光ミラーが使われているため、蛍光検出のファイバー端には動かないマルチスポットが結像している。このため偏光ミラーの偏光角に基づき画素番地が決定されることになる。

【0071】このような画素番地と偏光角の関係に基づき、マルチチャンネル光電子倍増管から並列的に得られる複数の蛍光検出信号は制御回路4' (図22) や4" (図26) により整理され、保存される。勿論このようなデータ処理には予め計測、検出の条件を入力しておく必要があり、これら入力情報は端末41'から入力されるか、或いは上位のコンピュータ40からこれら情報が入力され、必要に応じて、計測・検査結果のデータがコンピュータに送られる。

【0072】図26の実施形態で、複数の波長の異なる励起光を同時に照射する例を説明したが、例えば、複数の励起光とそれと組み合っている蛍光の波長帯が重複している場合には、重複するものについては光源に近いところにある図示しないシャッタを用いたり、光源そのもののON-OFFにより、時間をずらして蛍光検出することによりこのような問題を回避する。

【0073】図23は、励起光源に複数のほぼ同一波長の半導体レーザ111A2、111A2……を用いた実施形態である。半導体レーザは容積が小さく比較的高出力で、安価であるため、図に示すように多数の半導体レーザを用いて、マルチスポット光源を作ることにより、強いマルチスポット励起光をDNAチップに照射することが可能になり、高速検出が実現する。各半導体レーザから出射した光をレンズ112A1、112A2……によりファイバ120A1、120A2……の入射端に取り込む。

【0074】出射端から出射するレーザ光を図24に示すようにマイクロレンズアレイを介してピンホール配列111、112……に集光させ、この透過光をマルチスポット励起光として用いる。

【0075】励起光として半導体レーザを用いることができない場合には、半導体レーザ励起の高出力固体レーザや、高出力ガスレーザを用いる。このようなレーザ光源では出射ビームを図25に示すような方法で分割して用いると、ほぼ等しい強度で、ほぼ等しいビーム形状を有するマルチスポット励起光を形成することが可能になる。

20

【0076】即ち、レーザ光源111A'から出射したビームをマルチ分割ビームスプリッタ1110A'、1120A'……で分割する。分割する数をkとすると、分割の初段から2段、3段……k段目までのビームスプリットの反射率をr1、r2、…rn、…rnとする。rnは1であること、各ビームスプリット光は強度が等しいので、1≤j≤kの任意のjに対し、

$$r_j = 1 / (k - j + 1)$$

を満たすようにすればよい。即ち1110A'ではkが4、即ち4分割であるので、r1は1/4、r2は1/3、r3は1/2、r4は1となる。同様に1120A'は3分割であるのでr1は1/3、r2は1/2、r3は1となる。このように等しいビーム強度で、等しいビーム形状のレーザ光がレンズアレイ112A1'に入射し、ファイバの芯に入射する。

【0077】図23の実施形態では、複数の半導体レーザをマルチビームスポット発生の光源として用いているが、半導体レーザ以外のガスレーザや第2高調波によるレーザなどを複数用いてマルチスポット励起光を形成することも、入手できるレーザ光のパワーが不足する場合には必要になる。このような場合には図25に示す系を複数用いて、この複数の系から取り出されるファイバ出射端を1次元上或いは2次元上に配列することにより、励起強度の大きいマルチスポット光を得ることができる。

【0078】上記の複数の励起光を用いる場合、励起波長によっては半導体レーザ、ガスレーザ及び半導体励起の第2高調波を用いる固体レーザ等各種タイプの異なるレーザを用いる必要が生じる。このような場合に上記の図23や図25の方法でマルチスポット励起光を形成すればよい。

【0079】図27は本発明の実施形態を示す図であり、励起マルチスポット光がDNAチップに侵入した異物からの蛍光や散乱光、或いは検出光学系の異物からの散乱光の影響を除去し、精度の高い蛍光検出を実現するものである。1'は励起光源でファイバを介してピンホール開口アレイ14'を透過して励起マルチスポット光を作る。マルチスポット光はレンズ15と対物レンズ16によりDNAチップ上に縮像する。対物レンズの入射瞳の位置には空間フィルタ161がある。

【0080】励起マルチスポット光はこの瞳の中心から離れた163の位置を通過するように設定されている。即ち各マルチスポット光は図29、図30に示すように対物レンズの光軸から外れた部分を通り、図30に斜め斜線で示す1'の光束となって、DNAチップ2に斜め方向θ1の入射角で照射する。この照射収束光の収束角θ1は、先にスポット径とNA'の関係を説明したように、 $\sin(NA') = \theta_1 / 2$ となる。

【0081】また、DNAチップで正反射した励起光は、対物レンズを通過し、瞳161上で163とはレン

(12)

特開2001-108684

21

ズ光軸を対称の中心として対称な位置（図の162に相当する位置）を適る。

【0082】そこで、図28に示すように、ここに正反射光を遮光する部材162を形成しておけば、励起正反射光はこの162で遮光される。このように鏡の中心から外れた位置を励起光の主光線の光路にし、この主光線の入射角 θ_1 に対し、 $\theta_1 > \theta_1/2$ の条件を満たすようすれば、励起光を鏡上で遮ることなく、励起正反射光を鏡上で遮光することができる。本実施形態は図17の実施形態で説明した励起光による雜音除去の効果を有することは云うまでもない。

【0083】この効果に加え、図27の実施形態では、DNAチップ上或いは中に混入している異物の影響を、以下の様にして取る。即ち、DNAサンプル作成時に混入した各種蛋白質等の異物があると、これに励起光が照射すると、このような異物の寸法が数μmと小さいため、励起光が散乱する。また上記の有機物の様な異物の場合には異物から強い蛍光が発せられ、検出すべきDNAに付加している蛍光体より強い蛍光となる。

【0084】図30に示すように、散乱励起光は点で塗った対物レンズのNAで決まる領域L+Sを透過し、対物レンズを通過後、空間フィルタの遮光部163以外の部分を通り、蛍光検出系に漏れてくる。この漏れを波長分解ビームスプリッタ61で励起光だけ取り出し、像検出する。波長分解ビームスプリッタは蛍光を透過し、励起光を反射する。波長分解ビームスプリッタの挿入位置は図29では波長分解ビームスプリッタ30°の後の光路にあるが、前に置いても良い。このようにすることにより、異物で散乱した励起光が蛍光の画像がマルチチャンネル光電子倍増管等の検出器33'で検出されるのと同様に、励起光散乱像S100が検出器62により画像として検出される。

【0085】図31は、このように検出された蛍光像信号 D_L と励起光像信号 D_R を、各絵素毎の信号レベルで表している。即ち1, 2, …, 25は検出絵素番地を表し、(1), (2), (3), (4), (5)は同じDNA配列が付いているセルの番地である。即ち例えば1, 2, 3, 4, 5番地の絵素は(1)のセルに属する。実際にはセル内の絵素は2次元であり、例えば5×5絵素あるが、図を用いた説明を分かりやすくするために1次元にしている。異物がある絵素にかかっていればその絵素の散乱励起光は閾値 D_{th} を越える。

【0086】図31で、励起光像信号 D_L は絵素番地9, 10, 11及び16, 17, 18, 19, 20で閾値 D_{th} を越えている。従って、蛍光像検出信号 D_L の該当する番地の情報は異物の影響を強く受けているため、この番地の情報を除去して各セルの蛍光の平均値を求める。すなわち、セル番号(2)については絵素9, 10番地の情報は用いないで残りの6, 7, 8番地の情報のみを用いて平均値を算出する。同様にセル(3)に

22

ついては13, 14, 15のみの情報を用いて平均値を求める。セル(4)は他の絵素が異物で散乱しているためこのセルは無効とする。このようにして図31の下のグラフに示すようにセル内の平均強度を求めることにより、異物の影響を大幅に低減し、正確な蛍光検出ができるようになった。

【0087】なお、図27から30を用いて説明した異物の影響を除去する実施形態の光学系では、励起光が対物レンズを通してDNAチップを照明する光学系になっているが、対物レンズを直らずに対物レンズとDNAチップの間から斜めに照射し、散乱光を検出する構成でも良い。この場合には、正反射光が対物レンズに入射しないため、空間フィルタ(161に相当する)が不要になる。

【0088】図32は、本発明の実施形態を示す図である。1は既に詳細な実施形態を説明したマルチスポット励起光照射系であり、3は同じく詳細を説明したマルチスポット励起光で発生した蛍光を検出する蛍光検出系である。DNAチップ2の上にハイブリダイゼーションされているDNAに付いている蛍光に数μmの微小スポット励起光を対物レンズ16により照射するには、スポットサイズが一定に保たれるよう対物レンズと蛍光面を焦点深度内の一定の間隔に常時維持していかなければならない。このため剛性上対物レンズ16と構造的に一体になった焦点検出系7を用いる。焦点検出系7は斜めビームスポット照射系71とスポット位置検出系72から構成されている。斜めビームスポット照射系71はDNAチップ上の蛍光面に斜めから微小スポットを照射する。

【0089】図33はDNAチップの断面構造の1例である。この実施形態において蛍光面はΣ2面である。即ちガラス等の平坦な基板23上に蛍光面Σ2があり、この面とガラス基板21上の面Σ1の間に蛍光が付加された被検査DNAを含んだ液体を流し、ハイブリダイゼーションさせるための間隙22がある。DNA検査の段階ではこの間隙に液体を満たしておく。しかし場合によってはこの間隙を空にしておくこともある。また蛍光面をΣ1にし、基板23は不透明な材質や光を吸収する材料にしておくこともある。

【0090】斜めスポット照射系71から蛍光面で収束するように斜めから照射される光ビーム π_1 は上部基板21の上面Σ3と下面Σ1、及び下部基板23の上面Σ2と下面Σ4の4面で正反射する。斜め照射ビーム π_1 の主光線 π_1 が正反射した光線 $\pi_1, \pi_1, \pi_1, \pi_1$ は、結像レンズ721によりポジションセンサ722の受光面に等しい面上の P_3, P_1, P_2 、及び P_4 の位置にそれぞれ像を結ぶ。蛍光面の位置は予め決まっているので、面Σ3、Σ1、Σ2とΣ4がある程度離れていれば、検出したい面（この実施形態ではΣ2）のスポット像位置のみを受光し、それ以外のスポット像は受光窓口外となるように受光ポジションセンサ722

(13)

特開2001-108684

23

の寸法と、レンズ721の倍率を決めておけば、所望の検出面のみの高さ検出ができる。

【0091】即ち、この実施形態では、Σ2面からの正反射光のみをポジションセンサで捕らえ、ポジションセンサ上のスポット位置即ちΣ2面の高さ位置を検出することができる。制御回路4により、この検出情報に基づき対物レンズ、及び対物レンズと一体になった焦点検出系7を、駆動装置73により上下に駆動することにより常に合焦点状態で蛍光検出することが可能になる。

【0092】図33の斜め入射フォーカス検出光の入射角がブリュースター角に近いと、P偏向で入射させると表面での反射が非常に小さくなり、検出困難になる。従ってS偏向を用いる。S偏向にするとどのような入射角でもP偏向に比べ表面での反射率が高くなり有利である。

【0093】図34は本発明の実施形態図であり、対物レンズ16を通して焦点検出するものである。ファイバ74で図示しない近赤外半導体レーザ光源から導かれてきたレーザ光はファイバ出射ビームスプリッタ76を通りレンズ77、波長分離ビームスプリッタ300^o、対物レンズ16を通り、DNAチップ2の蛍光面に斜めから蛍光照射する。この照射光の入射角度θは対物レンズの開口NAに相当する($\sin\theta = NA$ なり)、8よりやや小さい入射角)大きさである。正反射した光は再び対物レンズを通り、ポジションセンサ73'上にチップ上の集光点に対応した位置に結像する。このようにすれば、図33の実施形態同様にして、チップの蛍光面のフォーカス位置を検出できる。本実施形態のように焦点検出に用いる光として、検出蛍光より波長の長い光を用いれば蛍光体を励起することなく、即ち、検出雜音を発生することなく、正確に焦点検出できる。

【0094】なお図34の波長分離ビームスプリッタ300^oは近赤外光を透過し、蛍光検出に用いる励起光及び蛍光は反射する。1次元励起光照射光学系1で形成された1次元励起光スポットアレイがレンズ15、波長選択ビームスプリッタ300^o及び対物レンズ16を介してDNAチップ2の蛍光面に照射される。発生した蛍光は蛍光検出光学系3により検出される。励起光スポットアレイ照射位置のアレイ方向の移動は波長選択ビームスプリッタを微回転することにより行う。

【0095】以上、実施形態の各例を用いて説明したDNAチップの蛍光検出をDNAチップの全セルに亘り行う方法を、以下に図35から40を用いて説明する。

【0096】図35はDNAチップの全体の構造を表している。204はDNAチップを実装している全体ケースである。DNAチップはこのケースにある窓200の内側のガラス基板であり、ケース204に固定されている。窓内側の領域202に蛍光物体を添付したDNA断片がハイブリダイゼーションされている。この202の領域の外で窓200の内側に、位置決め用のアライメント

24

マーク201が描画されている。

【0097】図2で説明したN×N(図5では5×5)の絃素(太い線で示す)分が同一のDNA情報の断片が描えられている(プローピングされている)セル20と、このアライメントマーク201の相対的な位置が10分の数μmの精度で設計、製作されている。

【0098】DNAチップを検査装置に搭載し、既にその実施形態を説明したDNA検査装置内に実装している(図示せず)アライメント検出光学系で少なくとも2つのアライメントマーク201の位置をマーク位置検出2次元CCD等でCCD上の位置として検出する。またこのマーク検出を行ったときのDNAチップの位置は、例えば図32に示すように、DNAチップが搭載されているチャックに設置されているx及びy方向の位置検出用測長器81及び82で検出する。

【0099】上記のCCD検出光学系の光軸と、前述の各種蛍光検出光学系における検出光軸との間隔は一定であるので、この間隔と、上記CCDのアライメントマーク検出位置と、測長器の検出位置から、DNAチップの各セルを更に細かくセル内を分割した絃素を正しい位置で検出することが可能になる。この際、2つ以上のアライメントマークの位置検出でDNAチップが回転していることが分かったなら、図示しない回転機構でこの回転を補正する。なお、この回転補正後の正しい位置検出は必要に応じて行う。またこの回転の補正を行わなくても回転量が小さければこの回転量を上記方法で検出し、この回転検出量に基づきxy座標を補正していくても良い。また上記のマルチスポット光の方を光学系の微小回転により補正して検出することも可能である。

【0100】以上説明したように、DNAチップ上のセル内の絃素を正確な位置決め精度で検出することが、アライメントマーク検出と、DNAチャックの測長によりできるので、以下に示す方法でチップ内の全絃素を順次光遠に限無く蛍光検出することができる。図35の2AはM個のマルチスポットアレイ励起光を照射し、スポットアレイ方向にN絃素分順次走査し、元の操作位置に戻るという動作を繰り返すと共に、チャックをy方向に走査することにより、チャックの1走査で検出される領域を表す。即ち、図36に示すようDNAチップ上の絃素2A101, 2A102, ..., 2A10Mが先ず同時に励起照明され、次に前述の方法により1絃素ピッチ△P分マルチスポットが移動し、これを順次続ける。

【0101】このようにしてN(k)絃素分移動すれば、合計MN(k)絃素分、即ちNM△Pの幅に亘り、1次元アレイ状に検出される。N(k)絃素分の走査が終われば、マルチスポットアレイを初めの位置に戻す。この間DNAチップは図39のy₁からy₂の間にy方向に1絃素分時間t₁からt₂の間のようにy方向に1絃素分時間t₁からt₂の間繰り返せば、領域2Aの全絃素に亘る蛍光検出が終了する。

(14)

特開2001-108684

25

26

【0102】上記の動作を図1の実施形態のDNA検査装置で行う場合、AO偏光器によるマルチスポット励起光の駆動信号、或いはスポットの移動位置は図3-8のS₁₁に示すように変化する。更に詳細に見れば図8のS₁₁のようにステップ移動している。また波長選択ビームスプリッタの偏光信号も図3-8のS₁₁同様に変化させる。時間t₁からt₂までこの変化を繰り返せば、領域2Aの全域を検出できる。

【0103】領域2Aの下の端まで検出されると(時間t₁)図4-0のx₁₁に示すようにDNAチップのチャックをx方向にNM△Pだけステップ移動する。ステップ移動後、図3-9の時間t₁後のy₁₁に示すようにチャックをyの逆方向に走査する。これと同時に図3-8の時間t₁後のS₁₁、ようにAO偏光器12及び波長選択偏向ビームスプリッタ30の偏向信号を領域2A検出時(時間t₁～t₂)とは逆方向に走査する。このようにすれば図3-7に示すように領域2Bを領域2Aの検出に引き続き継続的に検出できる。以上の動作をDNAチップのy方向について-方向と+方向に交互に繰り返せばDNAチップの2Aから2Jまで全チップを高速に検出することができる。

【0104】本実施形態でDNAチップを絶て検出するのに要する時間を説明する。チップ内のセル数し、各セルをN×N分割することにより、異物等の影響を回避することにする。このようにするとチップ内の全検出絃素数はLN²になる。マルチスポット励起光の同時照射スポット数をMとするし、同時にマルチスポットで検出する時間を△t₁とすると、スポットの移動や、チャックのx方向の移動による時間が蛍光検出する時間に比べ短いとして無視すると、全蛍光検出時間Tは次式で与えられる。

【0105】

$$T = LN^2 \Delta t / M \\ = LN^2 / (M / \Delta t)$$

マルチスポットのスキャン数kに対し、波長分離ビームスプリッタ30の応答時間t₁はk△t₁以上である必要がある。また光源のパワーは8M/△t₁以上必要である。また励起マルチスポット光の間隔は5以上がSNの上で望ましい。

【0106】蛍光検出に用いる光電子倍増管の量子効率は、蛍光波長が長い670nmでは5～10%と低くなる。また、励起に用いるレーザ光の出力の限界もある。このような条件を考慮し、できるだけ高速に検出するには、例えばk(=N)=10、M=50、△t=50μsとなり、セル数L=1000×1000、セル内分割絃素数N=5として、T=2.5sとなる。即ちLN²/(6×10⁵)秒以下の条件を満たす。ちなみに上記のLとNの値をこの条件に入れれば4.2秒になり、蛍光検出以外のサンプルチップの読み取り、検査条件の入力、結果の出力を含めて1分以内に検出するという条件を満足

する。

【0107】1分で検出可能になれば、多くの検体を検査する場合効率を發揮する。例えば従来5分かかっていた検査が1分で済むため、前処理に少々時間がかかるても、検体数が近くになると、前処理が通常多数の検体に対し平行してできるようにするため、5、6時間の時間短縮が図れる。

【0108】本発明によりこのような高速・高精度の検出が可能になるのはマルチスポットを同時に励起光に用いているためであり、しかも各スポットの励起光による蛍光検出に際し他の励起スポット光の影響を極力受けないようにスポット間隔を開けて検出しているからである。

【0109】

【発明の効果】以上説明した本発明により、DNAチップ上の多種、多数のDNAプローブにハイブリダイゼーションされた検査対象DNAを高速にかつ正確に蛍光検出することが可能になった。この結果、感染症の診断、遺伝子検査等を多数の検体に対し、高速・高精度に行なうことが可能になった。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施形態を表す図。

【図2】本発明の実施形態図で、マルチスポット照射を表す。

【図3】本発明の実施形態図で、マルチスポット照射の移動を表す。

【図4】本発明の実施形態図で、マイクロレンズアレイによるマルチスポット発生を表す。

【図5】本発明の実施形態図で、図1の実施形態を説明する図。

【図6】波長選択ビームスプリッタ固定時のスポット蛍光像の動きを説明する図。

【図7】波長選択ビームスプリッタ偏向時のスポット蛍光像の動きを説明する図

【図8】本発明の実施形態し、図1の各部品の動作、検出信号等を表す図。

【図9】図1の実施形態で、蛍光像検出面の像の動きを表す図。

【図10】図1の実施形態で蛍光検出面の受光開口を表す図。

【図11】本発明の実施形態図で、マルチスポットをプログラムで形成する図。

【図12】上記のプログラムを作成する方法を示す図。

【図13】本発明の実施形態を示す図。

【図14】図13の実施形態で用いる2次元マルチスポット発生用マイクロレンズアレイ。

【図15】本発明の実施形態で波長分離ビームスプリッタの特性を示す図。

【図16】本発明の実施形態で干渉フィルタの特性を示す図。

(15)

27

【図17】本発明の実施形態図で、励起光を空間フィルタで遮光する図。

【図18】上記空間フィルタの図。

【図19】本発明の実施形態図で、偏向を利用する励起光遮光法を示す図。

【図20】本発明の実施形態図で、1次元スポットアレイを2次元マルチチャンネルフォトマルチで検出する図。

【図21】上記図20の実施形態でファイバの入出射端とスポット像取り込みを示す図。

【図22】本発明の実施形態図で、励起光を複数の波長にして検出する図。

【図23】本発明の実施形態図で、複数の半導体レーザを励起光に用いる図。

【図24】本発明の実施形態図で、ファイバの出射端からマルチスポット光を得る図。

【図25】本発明の実施形態図で、1本のレーザビームからマルチスポットを得る図。

【図26】本発明の実施形態図で、励起光を複数の波長にして同時に検出する図。

【図27】本発明の実施形態図で、マルチスポット光を斜め照射し、正反射励起光を鏡上で遮光する図。

【図28】上記図27の鏡上の遮光部を示す図。

【図29】本発明の実施形態図で、励起散乱光を検出し異物位置を求め、蛍光検出結果を補正する方法を示す図。

【図30】上記図29の対物レンズとDNAチップとの間の励起正反射光と散乱励起光を示す図。

【図31】図29の異物散乱光の検出信号による補正の方法を示す図。

【図32】本発明の実施形態図で、フォーカス検出と、*30

特開2001-108684

28

*制御を示す図。

【図33】図32のフォーカス検出で、DNAチップの反射呼応を示す図。

【図34】本発明の実施形態図で、対物レンズを通してフォーカス検出する図。

【図35】本発明の実施形態で、DNAチップの全検査対象域を検出する方法を示す図。

【図36】図35の実施形態の拡大説明図

【図37】図35の実施形態の拡大説明図

10 【図38】図35の実施形態でマルチスポットの動きを示す図。

【図39】図35の実施形態でDNAチップチャックのx方向の動きを示す図。

【図40】図35の実施形態でDNAチップチャックのy方向の動きを示す図。

【符号の説明】

1 ……励起光照射光学系、10 ……マルチスポット形成光学系、11 ……光源系、12 ……AO偏向器、14 ……マイクロレンズアレイ、16 ……対物レンズ、14' ……マルチスポット発生ホログラム、2 ……DNAチップ、20 ……セル、201、202、212 ……蛍光検出検索、30 ……波長選択ビームスプリッタ偏向器、300 ……ミラー偏向器、32 ……光ファイバ、33 ……光電子倍増管、4、4' ……制御回路、41' ……入力端末、51、52、53、54 ……波長選択ビームスプリッタ、7 ……フォーカス検出系、73 ……は対物レンズとフォーカス系の微動機構、80 ……DNAチップチャック、81、82 ……DNAチップチャック位置制御装置、83 ……DNAチップチャック駆動機構である。

【図1】

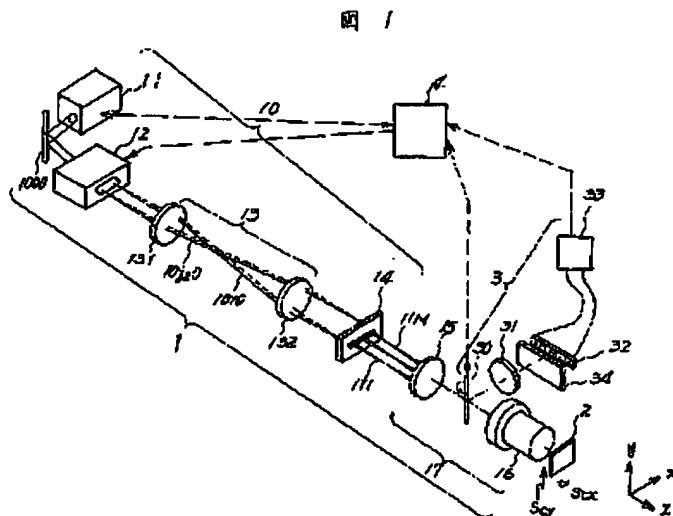


図 1

【図2】

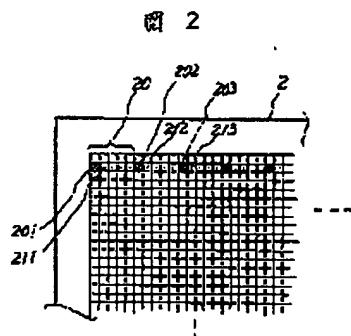
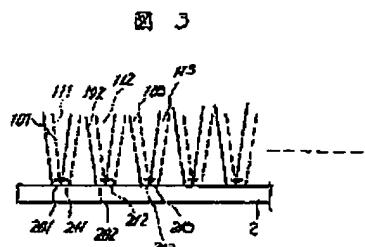


図 2

(15)

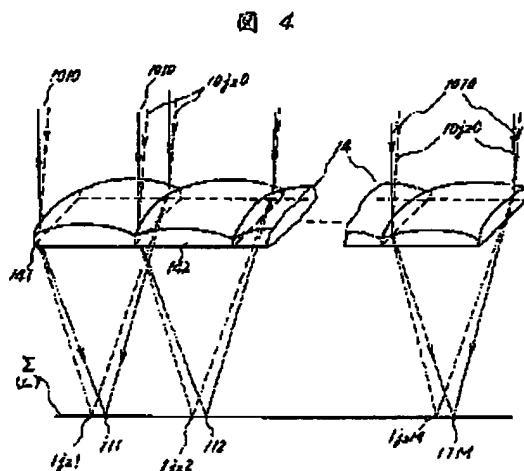
特關2001-108684

[图3]



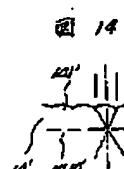
三

〔图4〕



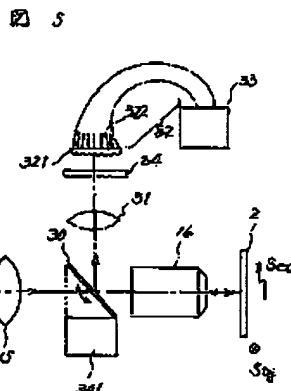
四 4

[图 14]



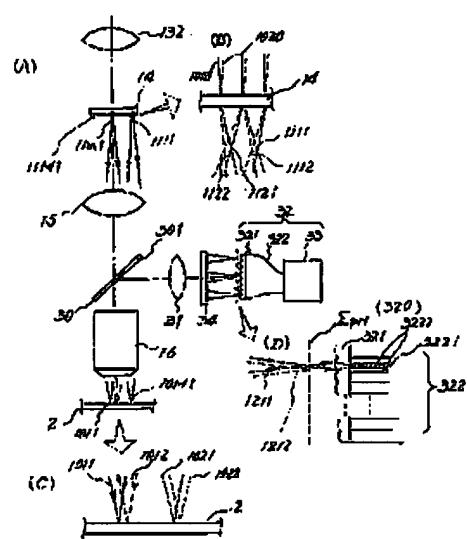
14

[図5]



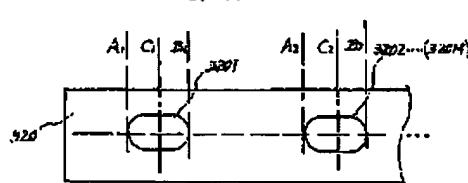
3

[図6]



四

[四] 〇



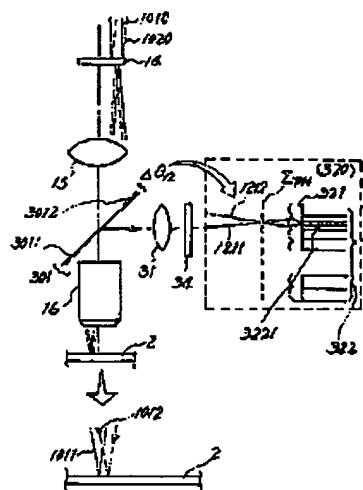
10

17

特開2001-108684

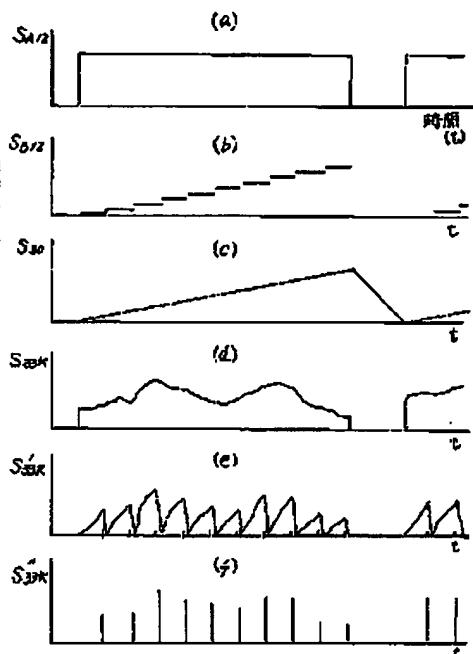
[图7]

7



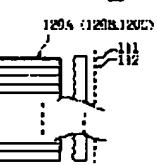
〔图8〕

四 8



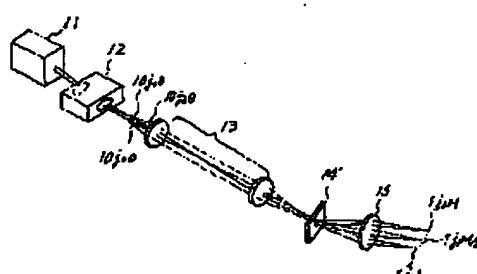
[24]

图 24



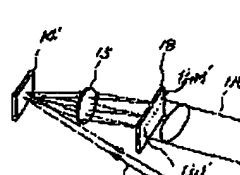
[1 1]

11



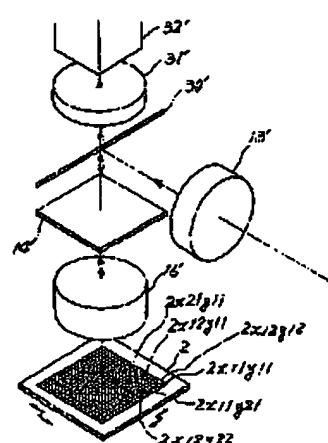
[图12]

四 12



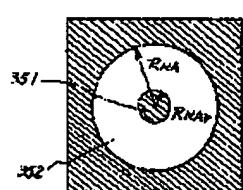
[図13]

五 13



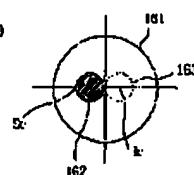
[圖 18]

四 18



[图28]

28

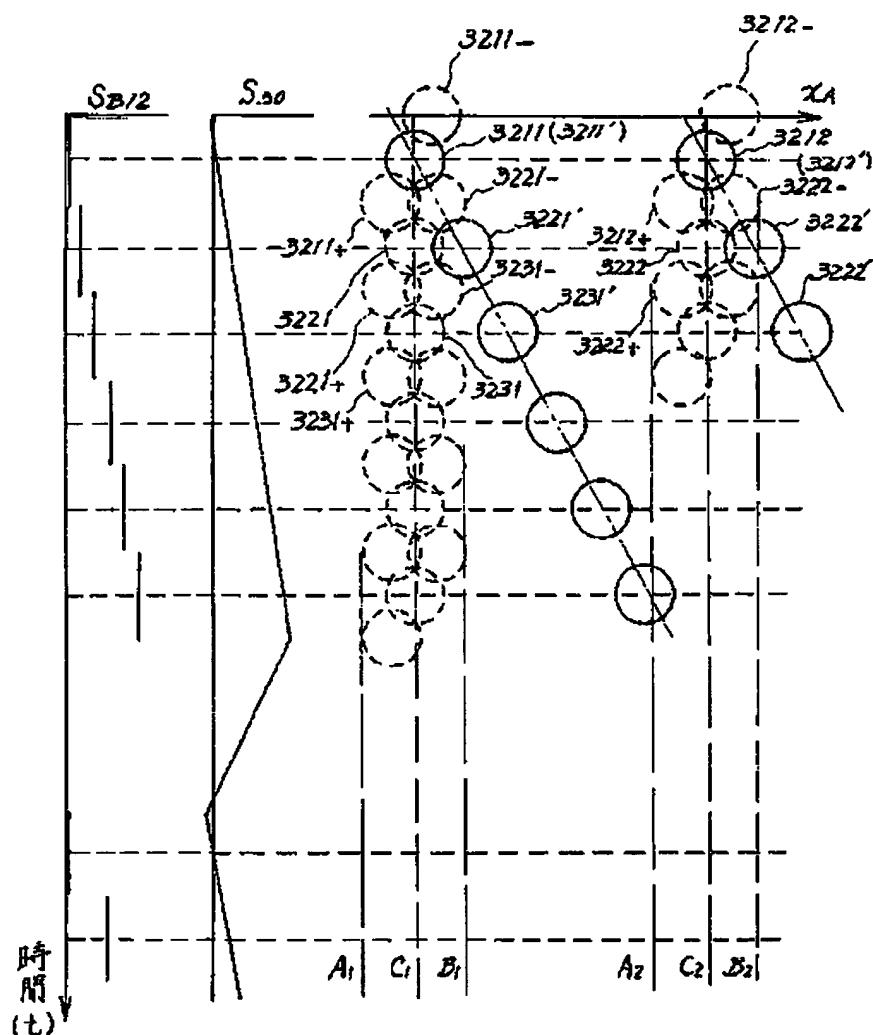


(18)

特開2001-108684

[图9]

圖 9

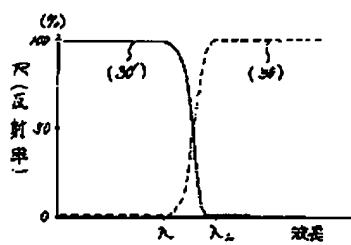


(19)

特明2001-108684

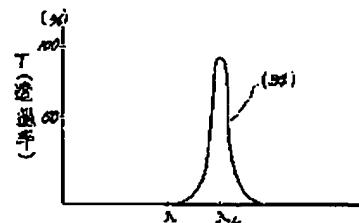
[图15]

四 15



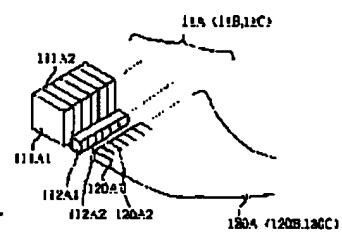
[16]

16



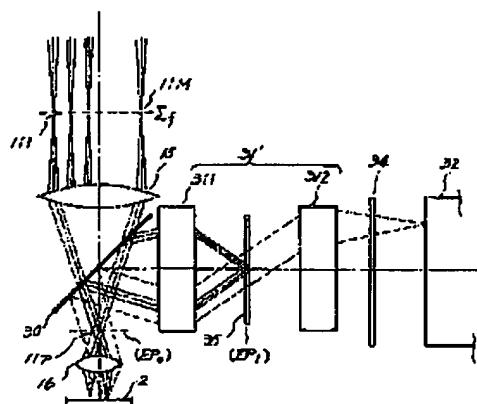
[图23]

图23



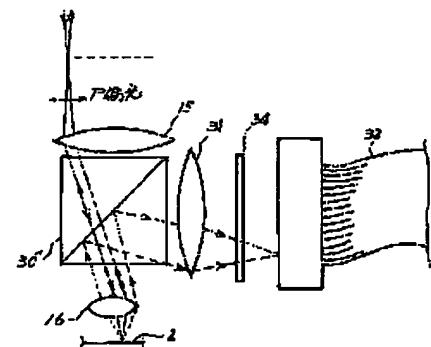
[图17]

四 17



[图 19]

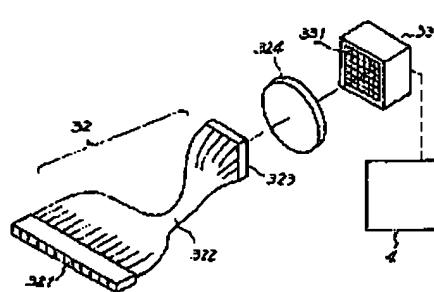
四 19



[图30]

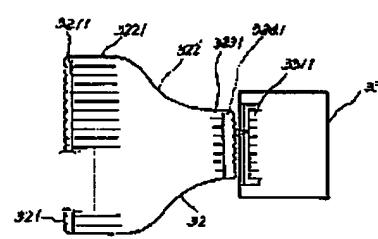
[圖29]

图 20

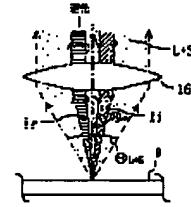


[图21]

圖 2



30

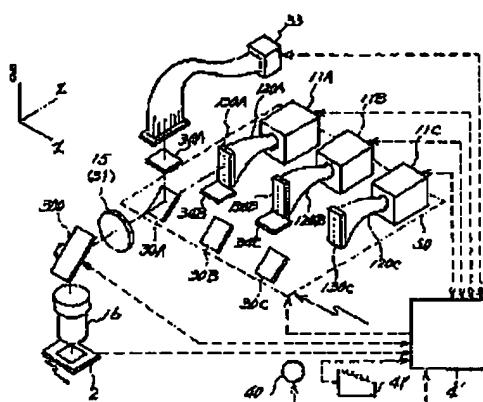


(20)

特開2001-108684

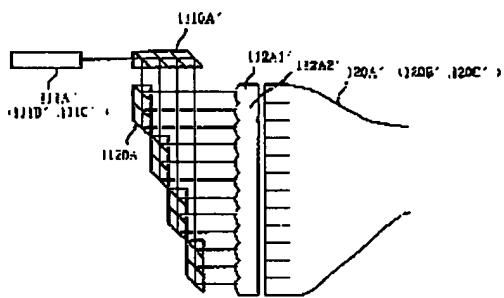
[图22]

四 22



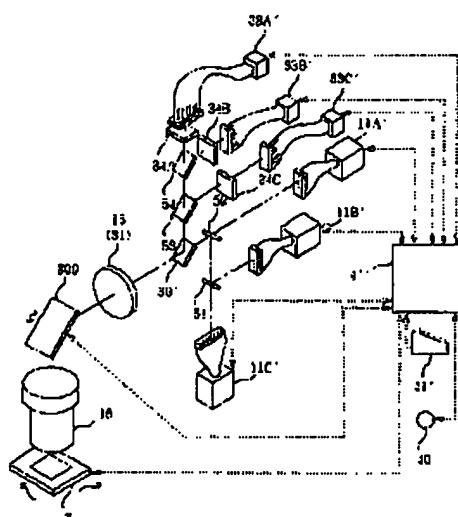
[図25]

图 25



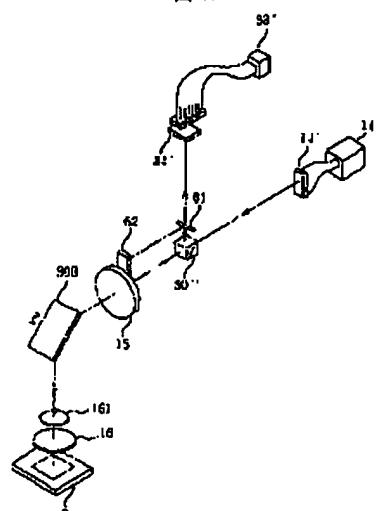
[图26]

圖 26



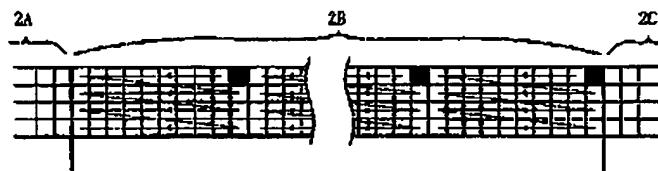
[图27]

図27



[37]

37

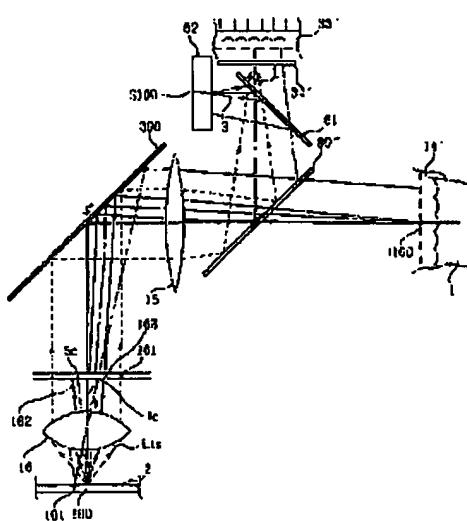


(21)

特開2001-108684

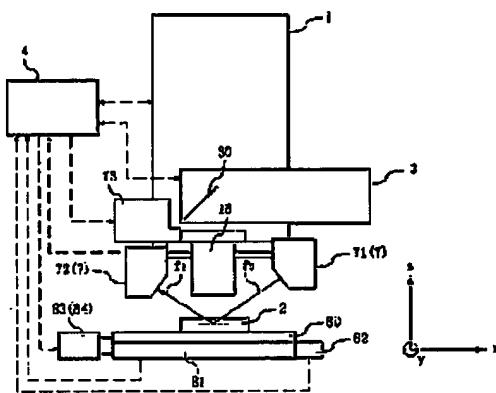
【図29】

図29



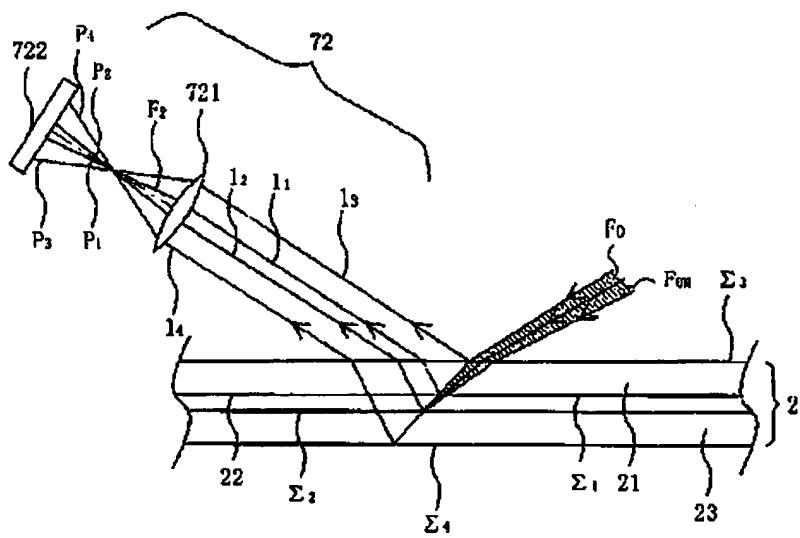
【図32】

図32



【図33】

図33

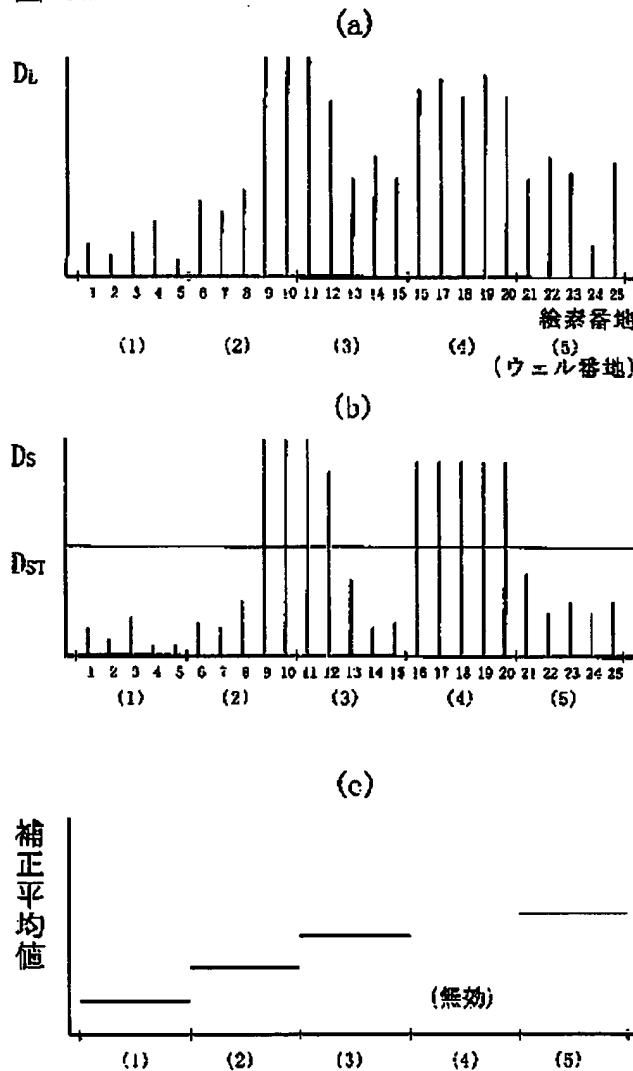


(22)

特開2001-108684

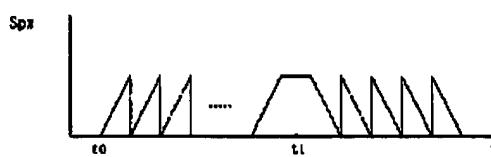
【図31】

図 31



【図38】

図 38



【図39】

図 39

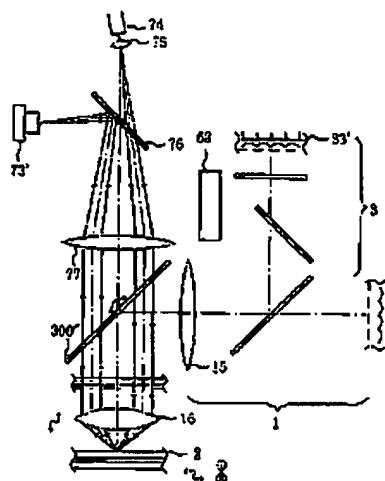


(23)

特開2001-108684

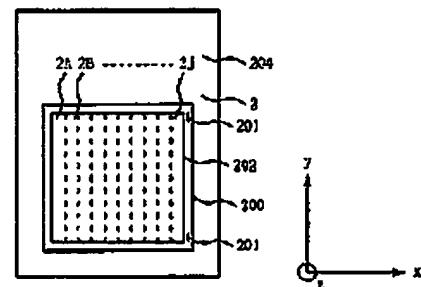
【図34】

図 34



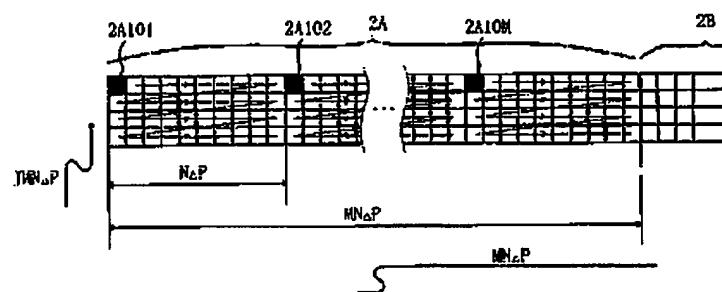
【図35】

図 35



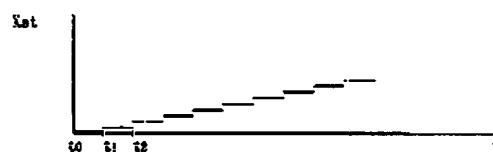
【図36】

図 36



【図40】

図 40



(24)

特開2001-108684

フロントページの続き

(51)Int.Cl.'	識別記号	F I	ト-コード(参考)
G 0 1 N	33/50	G 0 1 N	33/53
	33/53		33/565
	33/566	C 1 2 N	15/00
(72)発明者	坂田 智昭 神奈川県横浜市戸塚区吉田町292番地 株式会社日立製作所生産技術研究所内	F ターム(参考)	2G043 AA03 BA16 CA03 DA02 EA01 FA01 GA02 GA04 GB01 GB19 GB21 HA01 HA02 HA05 HA09 JA03 JA04 KA02 KA05 KA08 KA09 LA02 LA03 NA01
(72)発明者	保田 健二 茨城県ひたちなか市市毛882番地 株式会社日立製作所計測器グループ内	2G045 AA13 AA35 CA25 DA13 FA12 FA15 FA29 FB02 FB07 FB12 GC15 JA07 JA08	
(72)発明者	高橋 智 茨城県ひたちなか市市毛882番地 株式会社日立製作所計測器グループ内	4B024 AA11 AA19 CA04 HA14 4B029 AA07 AA23 FA10 4B053 GA01 QQ08 QQ42 QR32 QR66 QS34 QK02	